



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Caracterización *in silico* del gen *lip* de *Marinobacter* sp.
aislado de las Salinas de Pilluana**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biotecnología

AUTOR

Jhosep Shonatan AVILA OROYA

ASESOR

Amparo Iris ZAVALETA PESANTES

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Avila J. Caracterización in silico del gen lip de *Marinobacter* sp. aislado de las Salinas de Pilluana [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica / Unidad de Posgrado; 2018.



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR
AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN BIOTECNOLOGÍA**

Siendo las **10:00 hrs. del 10 de diciembre de 2018** se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Examinador y Calificador de tesis, presidido por la Dra. Doris Virginia Huerta Canales de Miranda e integrado por los siguientes miembros: Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes (Asesora), Dra. María Elena Salazar Salvatierra, Dra. Karim Lizeth Jiménez Aliaga y la Dra. Mirtha Roque Alcarraz; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: "**Caracterización *in silico* del gen *lip* de *Marinobacter* sp. aislado de las Salinas de Pilluana**", presentada por el Bachiller en Genética y Biotecnología **JHOSEP SHONATAN AVILA DROYA**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Biotecnología**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación el Jurado Examinador y Calificador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

Diecinueve (19) Excelente

Luego, la Presidenta del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Bachiller en Genética y Biotecnología **JHOSEP SHONATAN AVILA DROYA**, el Grado Académico de Magíster en **Biotecnología**.

Siendo las **11:40** hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las **11:50** hrs. del 10 de diciembre de 2018.

Dra. Doris Virginia Huerta Canales de Miranda (P.P., D.E.)
Presidenta

Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes (P.P., T.C.)
Miembro - Asesora

Dra. María Elena Salazar Salvatierra (P.P., T.C.)
Miembro

Dra. Karim Lizeth Jiménez Aliaga (P. Asoc., D.E.)
Miembro

Dra. Mirtha Roque Alcarraz (P. Asoc., T.C.)
Miembro

Observaciones:

Dedicatoria:

Este trabajo ésta dedicado a mi esposa, Mercedes del Pilar Palomino García, por su apoyo incondicional y por hacer de mí una mejor persona.

A mis padres por el esfuerzo que hicieron para sacar adelante a mi familia.

A mi asesora por el tiempo y los consejos que me brindó para poder realizar este trabajo.

Agradecimiento:

Esta tesis fue financiada
parcialmente por el contrato
N°017-FINCYT-PIBAP-2008 y
convenio 007-FONDECYT-2014

INDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. SITUACIÓN PROBLEMÁTICA	1
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	2
1.3. JUSTIFICACIÓN TEÓRICA	2
1.4. JUSTIFICACIÓN PRÁCTICA	2
1.5. OBJETIVOS	3
1.5.1. Objetivo general:	3
1.5.2. Objetivos específicos:	3
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1. MARCO EPISTEMOLÓGICO DE LA INVESTIGACIÓN	4
2.2. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	5
2.3 BASES TEÓRICAS	9
2.3.1. Importancia de las enzimas en la industria	9
2.3.2. Lipasas microbianas y su potencial biotecnológico	11
2.3.3. Clasificación de lipasas bacterianas	12
2.3.4. Estructura de las lipasas bacterianas	16
2.3.5. Estructura génica de las lipasas	17
2.3.6. Programas bioinformáticos utilizados para el análisis <i>in silico</i>	17
III. METODOLOGÍA	21
3.1. CULTIVO DE <i>Marinobacter</i> sp. LB	21
3.2. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO	21
3.3. AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES RIBOSÓMICOS 16S DE <i>Marinobacter</i> sp. LB.	22
3.4. AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>glut</i> DE <i>Marinobacter</i> sp. LB.	22
3.5. DISEÑO DE CEBADORES PARA EL GEN <i>lip</i>	23

3.6. AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>lip</i> MEDIANTE PCR	24
3.7. SECUENCIACIÓN DE LOS GENES RIBOSÓMICOS 16S, <i>glut</i> Y <i>lip</i> DE <i>Marinobacter</i> sp. LB	24
3.8. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS GENES RIBOSÓMICOS 16S DE <i>Marinobacter</i> sp. LB	25
3.9. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL GEN <i>glut</i> de <i>Marinobacter</i> sp. LB.	26
3.10. ANÁLISIS EVOLUTIVO DEL GEN <i>lip</i> DE <i>Marinobacter</i> sp. LB.	26
3.11. ANÁLISIS <i>in silico</i> DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA LIPASA DE <i>Marinobacter</i> sp. LB.	27
3.12. ANÁLISIS <i>in silico</i> DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA Y TERCIARIA DE LA LIPASA DE <i>Marinobacter</i> sp. LB.	28
3.12.1. Selección de la estructura molde	28
3.12.2. Modelamiento homólogo	28
3.12.3. Validación del modelamiento	29
3.12.4. Acoplamiento molecular	29
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS	31
4.1.1. Extracción de ADN genómico	31
4.1.2 Amplificación de los genes ribosómicos 16S de <i>Marinobacter</i> sp. LB.	32
4.1.3. Análisis filogenético de los genes ribosómicos 16S de <i>Marinobacter</i> sp. LB.	32
4.1.4. Amplificación del gen <i>glut</i> de <i>Marinobacter</i> sp. LB.	38
4.1.5. Análisis filogenético del gen <i>glut</i> de <i>Marinobacter</i> sp. LB.	39
4.1.6. Diseño de cebadores para el gen <i>lip</i> de <i>Marinobacter</i> sp. LB.	41
4.1.7. Amplificación del gen <i>lip</i> mediante PCR	42
4.1.8. Análisis evolutivo del gen <i>lip</i> de <i>Marinobacter</i> sp. LB.	44

4.1.9. Análisis <i>in silico</i> de la estructura primaria de la lipasa de <i>Marinobacter</i> sp. LB.	46
4.1.10. Análisis <i>in silico</i> de la estructura secundaria y terciaria de la lipasa de <i>Marinobacter</i> sp. LB.	53
4.1.10.1 Validación del modelamiento	57
4.1.10.2. Acoplamiento molecular	61
4.2. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	64
CONCLUSIONES	71
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXOS	80
Anexo N° 1	80
Anexo N° 2	81
Anexo N° 3	86
Anexo N° 4	88
Anexo N° 5	89

INDICE DE TABLAS

Tabla N° 1. Cepas utilizadas en el análisis filogenético de los genes ribosómicos 16S de <i>Marinobacter</i> sp. LB	34
Tabla N° 2. Cepas utilizadas en el análisis filogenético de los genes ribosómicos 16S de <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	35
Tabla N° 3. Cepas del género <i>Marinobacter</i> utilizadas en el análisis filogenético del gen <i>glut</i> de <i>Marinobacter</i> sp. LB	39
Tabla N° 4. Cebadores diseñados <i>in silico</i> para la amplificación del gen <i>lip</i> de <i>Marinobacter</i> sp. LB	42
Tabla N° 5. Datos de la regresión lineal para determinar el tamaño experimental del gen <i>lip</i> de <i>Marinobacter</i> sp. LB, utilizando electroforesis	43
Tabla N° 6. Código de acceso de secuencias nucleotídicas de genes <i>lip</i> de especies cercanas a <i>Marinobacter</i> sp. LB	45
Tabla N° 7. Códigos de acceso de secuencias aminoacídicas de lipasas de la familia I utilizadas para el análisis y clasificación de la lipasa de <i>Marinobacter</i> sp. LB	47
Tabla N° 8. Composición de aminoácidos presentes en la cadena inmadura de la lipasa de <i>Marinobacter</i> sp. LB	52
Tabla N° 9. Comparación de aminoácidos de lipasas de <i>Marinobacter</i> sp. LB con cepas de referencia	54
Tabla N° 10. Lipasas utilizadas en la validación del programa HEX	62

INDICE DE FIGURAS

<p>Figura N° 1. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de lipasas bacterianas, de las subfamilias I.1 y I2. En negrita se observan las regiones conservadas entre las secuencias. Los círculos negros representan los aminoácidos de la triada catalítica; los círculos blancos son los residuos de cisteína que van a formar el puente disulfuro; los triángulos son los aminoácidos implicados en el sitio de unión al Ca^{++}. Imagen tomada de Arpigny & Jaeger (1999).</p>	13
<p>Figura N° 2. Vista parcial de las secuencias conservadas en la familia II. Los círculos negros representan los residuos de la triada catalítica; el círculo blanco indica un residuo de aspartato (Asp) del sitio activo, propuesto por Brumlik y Buckley, 1996 para la lipasa de <i>Aeromonas hydrophila</i> (Brumlik & Buckley, 1996). Imagen tomada de Arpigny & Jaeger (1999)</p>	14
<p>Figura N° 3. Alineamiento de secuencias pertenecientes a la familia IV. La primera secuencia pertenece a una lipasa sensible a hormonas. Los círculos negros representan los residuos del sitio activo. A la izquierda se observa el motivo HGGG y cadena arriba el pentapéptido GDSAG. Imagen tomada de Arpigny & Jaeger (1999).</p>	14
<p>Figura N° 4. Alineamiento de secuencias de las familias V y VI. Los círculos negros representan los residuos que conforman el sitio activo de las enzimas. En a) se observa a la familia V, siendo el primer microorganismos del alineamiento <i>Pseudomonas oleovorans</i> en cual sintetiza para una PHA depolimeraza. En b) se encuentra la familia VI, el 40% de aminoácidos son similares con fosfolipasa A_2 Ca^{++} independiente (Datos no mostrados). Imagen tomada de Arpigny & Jaeger (1999).</p>	15
<p>Figura N° 5. Gel de agarosa al 1 % conteniendo ADN genómico de <i>Marinobacter</i> sp. LB (flecha blanca). Líneas: M1, muestra de ADN genómico; MP, marcador de peso molecular; B, blanco.</p>	31
<p>Figura N° 6. Gel de agarosa al 1 % conteniendo los genes ribosómicos 16S de <i>Marinobacter</i> sp. LB (flecha blanca). Líneas: M2, producto de PCR; B, blanco; MP, marcador de peso molecular.</p>	32
<p>Figura N° 7. Árbol filogenético (ML) realizado con las secuencias de los genes ribosómicos 16S de las especies pertenecientes al género <i>Marinobacter</i>. Posicionamiento de <i>Marinobacter</i> sp. LB en el (●). Se utilizó a <i>Salinibacter ruber</i> M31 como grupo externo. El valor del Bootstrap fue de 1000 replicaciones y la barra de 0,05 % indica la divergencia de las secuencias.</p>	37
<p>Figura N° 8. Árbol filogenético (ML) realizado con las secuencias de los genes ribosómicos 16S de especies pertenecientes a <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>. Posicionamiento de <i>Marinobacter</i> sp. LB en el (●). Las especies <i>Marinobacter alkaliphilus</i> 2PR56-13 y <i>Marinobacter daepoensis</i> SW-156 se comportaron como grupos externos. El valor del Bootstrap fue de 1000 replicaciones y la barra de 0,002 % indica la divergencia de las secuencias</p>	38

Figura N° 9. Gel de agarosa al 1 % conteniendo el gen <i>glutB</i> de <i>Marinobacter</i> sp. LB (flecha blanca). Líneas: B, blanco; MP, marcador de peso molecular (DNA Ladder 1 Kb); M3, producto de PCR.	39
Figura N° 10. Árbol filogenético (ML) realizado con las secuencias <i>glut</i> de especies cercanas a <i>Marinobacter</i> sp. LB (●). <i>Pseudomonas fluorescens</i> FW300-N2C3 fue utilizada como grupo externo. El valor del Bootstrap fue de 1000 replicaciones y la barra de 50 % indica la divergencia de las secuencias.	40
Figura N° 11. Cebadores diseñados para amplificar el gen <i>lip</i> de <i>Marinobacter</i> sp. LB, usando el programa PRIMER3 (Untergasser <i>et al.</i> , 2012; Koressaar & Remm, 2007).	41
Figura N° 12. Gel de agarosa al 1 % conteniendo el gen <i>lip</i> de <i>Marinobacter</i> sp. LB (Flecha blanca) amplificado por PCR, utilizando los cebadores Mlip2 forward y reverse. Líneas: B, blanco; MP, marcador de peso molecular.	43
Figura N° 13. Gráfico de regresión lineal y ecuación, realizados a partir del marcador ADN 1 kb ladder (Invitrogen).	44
Figura N° 14. Árbol filogenético (ML) realizado con las secuencias del gen <i>lip</i> de especies con altos porcentajes de similitud con <i>Marinobacter</i> sp. LB (●). El valor del Bootstrap fue de 1000 replicaciones y la barra de 50 % indica la divergencia de las secuencias.	46
Figura N° 15. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de lipasas de la Familia I, incluido <i>Marinobacter</i> sp. LB aislado de las Salinas de Pilluana. Las letras con cuadros negros representan aminoácidos conservados en distintas especies; mientras que los cuadros plomos, aminoácidos con propiedades similares. Los ****, representan las secuencias conservadas que incluyen a los aminoácidos catalíticos.	50
Figura N° 16. Secuencia aminoacídica de lipasa de <i>Marinobacter</i> sp. LB. -----, secuencia de la lipasa madura con 284 aminoácidos; [GXSG], pentapéptido conservado de la familia I; SDH, triada catalítica; C, residuos de cisteínas formadores del puente disulfuro; D, residuos de ácido aspártico que forman enlaces con Ca ²⁺ .	51
Figura N° 17. Identificación del péptido señal en la secuencia de Lipasa de <i>Marinobacter</i> sp. LB. Los score de Y, C y S fueron 22, 25 y 25 respectivamente, siendo la media aritmética de los análisis la posición 24 como longitud del péptido señal.	53
Figura N° 18. Alineamiento de aminoácidos entre lipasas de <i>Marinobacter</i> sp. LB (Model_01) y de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 (upload.1.A). Realizado con el programa Swiss-PDB Viewer (Guex & Peitsch, 1997).	55
Figura N° 19. Disposición de las estructuras secundarias en el modelado de la Lipasa de <i>Marinobacter</i> sp. LB con el programa Swiss-PDB Viewer (Guex & Peitsch, 1997).	56

Figura N° 20. Lipasa de <i>Marinobacter</i> sp. LB modelada con el programa Swiss-PDB Viewer (Guex & Peitsch, 1997) y presentada con Discovery Studio 2017 R2 (Dassault Systèmes BIOVIA, San Diego, CA, USA). Láminas- β , regiones color turquesa; α -Hélices, espirales rojas.	57
Figura N° 21.1. Diagrama General Ramachandran de la lipasa modelada de <i>Marinobacter</i> sp. LB, donde se visualiza las regiones energéticamente permitidas para los ángulos Phi (Φ) y Psi (Ψ). La región media derecha, superior y media izquierda, pertenecen a las α -hélices con giro a la izquierda, láminas- β y α -hélices con giro a la derecha, respectivamente.	58
Figura N° 21.2. Diagrama Ramachandran desglosado. Muestra las regiones favorecidas (zonas oscuras), permitidas (zonas claras) y rechazadas (zona blanca), en donde se encuentran 261 (cuadrados, aspas, puntos y triángulos negros), 17 (cuadrados y aspas naranjas) y 4 aminoácidos (cuadrados y triángulos rojos), respectivamente. El diagrama muestra las parcelas de los posibles ángulos Φ y Ψ de los aminoácidos en general, glicina, pre-prolina y prolina.	59
Figura N° 22. Diagrama ERRAT (Colovos & Yeates, 1993) para la lipasa modelada de <i>Marinobacter</i> sp. LB. Las barras blancas representan regiones con menor tasa de error para el plegamiento de proteínas, las negras indican regiones plegadas de manera errónea y las grises representan regiones con error entre el 95 y 99%.	60
Figura N° 23. Diagrama de compatibilidad entre la estructura 3D y 1D de la lipasa modelada de <i>Marinobacter</i> sp. LB. Los valores máximos de los puntajes son +1 (buen puntaje) y -1 (mal puntaje). La mayor cantidad de puntajes positivos, mayor la probabilidad de haber realizado un buen modelado de proteínas.	61
Figura N° 24. Región del sitio activo de la lipasa de <i>Marinobacter</i> sp. LB pronosticado con el programa HEX (Ritchie <i>et al.</i> , 2008) y presentada con Discovery Studio 2017 R2 (Dassault Systèmes BIOVIA, San Diego, CA, USA). Presencia de tributirina dentro del círculo amarillo.	62
Figura N° 25. A. interacción entre la tributirina y los aminoácidos del bolsillo de interacción de la lipasa de <i>Marinobacter</i> sp. LB generada por HEX (Ritchie <i>et al.</i> , 2008) y presentada con Discovery Studio 2017 R2 (Dassault Systèmes BIOVIA, San Diego, CA, USA). B, vista detallada de aminoácidos que participan en el bolsillo de interacción. Líneas verde oscuro, puentes de hidrógeno; líneas rosadas, interacciones alquilo; líneas verde claro, interacciones Van Der Waals.	63

RESUMEN

El objetivo del estudio fue caracterizar *in silico* el gen *lip* de *Marinobacter* sp. LB aislado de las Salinas de Pilluana, San Martín. Para lo cual, se extrajo y purificó ADN de esta bacteria. Luego, se amplificó el gen *lip* mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos y el producto amplificado fue secuenciado. Posteriormente, se realizó la caracterización *in silico* que incluyó el diseño de cebadores para el gen *lip*; análisis evolutivos utilizando los genes ribosómicos 16S y *lip*; análisis estructurales del gen *lip*, modelamiento por homología del producto génico empleando como molde a la lipasa 1EX9 de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, validación de la estructura terciaria considerando la calidad estereoquímica de los puntos de Ramachandran y el entorno de los aminoácidos; y acoplamiento molecular proteína-sustrato. Los análisis evidenciaron que la cepa en estudio se encuentra muy relacionada a *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. El gen *lip* midió 927 pb; y la proteína madura, 284 aminoácidos distribuidos en once α -hélices periféricas y siete láminas- β internas. La lipasa de *Marinobacter* sp. LB pesó 29.99 kDa y presentó un pI de 8.89, así como, los residuos Ser78, Asp229 e His251, típicos de la triada catalítica de lipasas de la familia I. La región del bolsillo de unión y su afinidad por lípidos fue demostrada realizando un acoplamiento molecular con tributirina con energía de -248.11 kcal/mol. En conclusión, el análisis *in silico* indicó que *Marinobacter* sp. LB contiene una lipasa de la familia I, con aminoácidos conservados en la triada catalítica.

Palabras clave: Análisis *in silico*, *Marinobacter* sp., gen *lip*, lipasa

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize *in silico* the *lip* gene of *Marinobacter* sp. LB isolated from Salinas de Pilluana, San Martín. So that, bacterial DNA was extracted and purified. Then *lip* gene was amplified by polymerase chain reaction with specific primers and amplification product was sequenced. Subsequently, *in silico* characterization was carried out including design of primers for *lip* gene; evolutionary analysis using ADNr 16S and *lip* genes; structural analysis of *lip* gene, homology modelling of gene product using 1EX9 lipase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 as a template, validation of tertiary structure considering stereochemical quality of Ramachandran points and amino acid environment; and protein-substrate molecular docking. Analysis showed that the strain under study is closely related to *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. The *lip* gene length 927 bp and mature protein, 284 amino acids distributed in eleven peripheral α -helices and seven internal β -sheets. The lipase from *Marinobacter* sp. LB weight 29.99 kDa and exhibit a pI of 8.89, as well as residues Ser78, Asp229 and His251, typical of catalytic triad of family I lipases. The region of binding pocket and its affinity for lipids was demonstrated performing a molecular coupling with tributyrin with energy of -248.11 kcal/mol. In conclusion, *in silico* analysis of *lip* gene indicated that *Marinobacter* sp. LB has a family I lipase with conserved catalytic triad amino acids and others participating in binding pocket.

Keywords: *in silico* analysis, *Marinobacter* sp., gen *lip*, lipase.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. SITUACIÓN PROBLEMÁTICA

Debido a la gran demanda de lipasas por parte de las industrias, existe una búsqueda constante de estas enzimas, que soporten condiciones exigentes de reacción dentro de los bioprocesos industriales. Los microorganismos y en especial, algunas bacterias halófilas del género *Marinobacter* producen lipasas versátiles e idóneas para este fin. Sin embargo, la producción y recuperación de estas macromoléculas son aún bajas.

Existen alternativas para mejorar la producción de enzimas y metabolitos de interés comercial como la optimización de los bioprocesos y la obtención de proteínas recombinantes. La combinación de ambas técnicas permite desarrollar bioprocesos eficientes a mayor escala y menor costo.

Para obtener una proteína recombinante es primordial conocer la secuencia de nucleótidos y la estructura génica de interés para luego utilizar un organismo hospedero que pueda expresar la enzima. Los bioprocesos para la obtención y purificación de los productos se pueden optimizar cuando se conocen las propiedades fisicoquímicas de las moléculas y en caso de las enzimas, el conocimiento de los aminoácidos que intervienen en el sitio activo y los que actúan en el plegamiento, así como la estructura terciaria y el mecanismo de interacción con sus sustratos, permiten disminuir el número de experimentos.

La caracterización del gen *lip* de *Marinobacter* sp. LB permite reconocer algunas de las propiedades mencionadas anteriormente. Este

procedimiento es posible diseñando cebadores específicos y amplificando la región de interés. Con la secuencia nucleotídica se realizan los análisis *in silico*, utilizando programas bioinformáticos destinados para los estudios evolutivos, estructurales, de validación y acoplamiento molecular.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Es posible caracterizar *in silico* el gen *lip* de *Marinobacter* sp. LB aislado de las Salinas de Pilluana. Y así, conocer su estructura, características bioquímicas, afinidad con sustratos y potencial biotecnológico?

1.3. JUSTIFICACIÓN TEÓRICA

El presente trabajo de investigación busca generar nuevos conocimientos acerca de la estructura génica de las lipasas de *Marinobacter* sp. LB, las cuales son versátiles y de interés para la industria farmacéutica, cosmética, petroquímica y de alimentos.

1.4. JUSTIFICACIÓN PRÁCTICA

También contribuye a fortalecer la línea de investigación de enzimas y metabolitos de interés industrial a partir de microorganismos de ambientes extremos.

Los datos generados de la secuencia genética y su amplificación pueden ser utilizados en procesos de clonación y producción de proteínas

recombinantes. Por otro lado, las propiedades fisicoquímicas y estructurales permiten elaborar nuevas estrategias para los procesos de filtración, precipitación, diálisis, cromatografía y electroforesis de la lipasa obtenida en bioprocesos de producción. Asimismo, los estudios de acoplamiento molecular permiten dislucidar los posibles sutratos de la enzima haciendo eficientes las pruebas experimentales.

1.5. OBJETIVOS

1.5.1. Objetivo general:

- Caracterizar *in silico* el gen *lip* de *Marinobacter* sp. LB aislado de las Salinas de Pilluana

1.5.2. Objetivos específicos:

- Diseñar cebadores específicos para el gen *lip* de *Marinobacter* sp. LB a partir de secuencias obtenidas de bases de datos de libre acceso.
- Amplificar y secuenciar el gen *lip* de *Marinobacter* sp. LB.
- Caracterizar *in silico* el gen *lip* de *Marinobacter* sp. LB, realizar el modelamiento de la lipasa e identificar su estructura tridimensional.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. MARCO EPISTEMOLÓGICO DE LA INVESTIGACIÓN

Desde los inicios de las sociedades humanas, siempre existieron fenómenos y eventos naturales que no podían ser explicados por el hombre, limitado por sus conocimientos y la tecnología de su época. Por ejemplo, el origen de la vida, la caída de una manzana, la distancia entre nuestro planeta y la luna, la formación de las montañas, el desarrollo de los organismos, la generación y desaparición de galaxias, son algunas interrogantes que nos siguieron por años. Con la finalidad de poder explicar dichas interrogantes los primeros filósofos postularon algunas teorías empleando métodos empíricos, racionales y transcendentales. Posteriormente, los hombres de ciencia emplearon el método científico, utilizando a las pruebas experimentales y modelos matemáticos como herramientas para entender los fenómenos y eventos que no tenían explicación y que aún nos aquejan.

Es evidente, que la tecnología actual nos permite utilizar modelos matemáticos e inclusive algoritmos complejos como herramientas para analizar información proveniente de organismos biológicos y pronosticar su funcionamiento. De esta manera, los estudios *in silico* permiten un mejor entendimiento de los sistemas de manera rápida y a menor costo, adicionalmente los datos obtenidos pueden ser aprovechados para tener procesos más eficientes en las áreas de biotecnología, farmacéutica, cosmética, entre otros.

2.2. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Las técnicas moleculares permiten identificar, caracterizar y expresar genes de interés, en hospederos conocidos y fáciles de manipular. Así, Jorgensen, Skov & Diderichsen (1991) elaboraron genotecas utilizando como hospedera a *E. coli*, mediante esta estrategia clonaron y expresaron genes *lipA* de una lipasa extracelular de *Pseudomonas cepacia* DMS 3959 con más de 1860 pares de bases (bp) que codifican un precursor con un péptido señal de 44 aminoácidos (aa) y una proteína madura de 320 aa. También identificaron el gen *limA*, modulador de lipasa que confiere el fenotipo lipasa positiva a los hospederos, probablemente se trata de una proteína que interviene en estabilización, protección o secreción de la enzima. El mismo año Ihara, Kageyama, Hirata Nihira & Yamada (1991) lograron clonar el gen *lipL* de *Pseudomonas nov. sp.* 109 que codifica para una estearasa madura de 311 aa y 26 aa del péptido señal.

Frenken, Egmond, Batenburg, Bos, Visser & Verrips (1992) lograron determinar los aminoácidos del sitio catalítico del gen *lipA* de *Pseudomonas glumae* PG1, mediante técnicas de clonaje molecular, utilizando *E. coli* S17-1 como hospedero. De esta manera determinaron que dicho gen posee 1077 pb y la proteína madura de 319 aa, además observaron que la triada catalítica de la lipasa de *P. glumae* PG1 está conformada por Serina 87, Ácido aspártico 241 e Histidina 285, homólogo a las lipasas de *Pseudomonas*.

Tan & Miller (1992) lograron clonar y expresar, en *E. coli*, el gen *lip* de *Pseudomonas fluorescens* B52, utilizando genotecas. Dicho gen contiene un marco de lectura abierto de 1428 pb y 7 bp más arriba de la secuencia Shine-Dalgarno. El producto del gen *lip* presentó un peso molecular 50,241 kDa aproximadamente con aminoácidos altamente conservados en el dominio de unión al sustrato.

Wohlfarth *et al.* (1992) clonaron dos genes *lip* de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. El gen *lipA* de 936 bp, codifica una verdadera lipasa y presentó un peso molecular de 30,134 kDa, 311 aa y la región consenso Gly-His-Ser-His-Gly, según análisis *in silico*. El gen *lipH*, codifica una proteína hidrofílica de 238 aa, presenta cierta homología al gen *limA* de *Pseudomonas cepacia*, esta proteína es necesaria en la expresión de la lipasa activa. Oshima-Hirayama *et al.* (1993) encontraron los genes *lipA* y *lipB*, los cuales codifican para una lipasa y una proteína no enzimática respectivamente; esta última facilita la activación de la lipasa.

Saeed, Zaghloul, Khalil & Abdelbaeth (2006) elaboraron una genoteca para aislar y clonar el gen *lip* de *Pseudomonas aeruginosa*, los clones con actividad hidrolítica contenían un fragmento de ADN de 1,2 kb, la proteína pesó 15 kDa.

Las técnicas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), el secuenciamiento de ácidos nucleicos y la bioinformática han permitido desarrollar nuevas metodologías para clonar genes de manera directa a partir del ADN cromosómico. Por ejemplo, Kim, Park & Yang (1994) lograron clonar el gen *lip* de *Pseudomonas fragi* IFO 12049, mediante PCR, utilizando cebadores con sitios de reconocimiento para *EcoRI* y *HindIII*, los cuales sirvieron para ligar el amplificado al plásmido pGEX-2T, el gen fusionado se introdujo en *E. coli* MC1061 y se indujo por isopropil-B-D-tiogalactosidasido (IPTG). El gen *lip* presentó un ORF de 1050 bp con alta expresión.

Alquati, Gioia, Santarossa, Alberghina, Fantucci & Lotti (2002) lograron amplificar y clonar en *E. coli* una lipasa de 879 bp de *Pseudomonas fragi* IFO3458 utilizando cebadores en base a la secuencia de la lipasa de

P. fragi IFO 12049. Mediante análisis *in silico* determinaron 293 aa, con peso molecular de 32,086 kDa y un punto isoeléctrico de 9,33. El mismo año Ruiz, Blanco, Pastor & Diaz (2002), realizaron un alineamiento de genes *lip* de diferentes especies del género *Bacillus* para diseñar cebadores y clonar el gen *lipA*, subfamilia I.4 de *Bacillus megaterium* 370, mediante PCR-inversa, obteniendo un producto de 633 bp que codificaba una proteína de 210 aa.

An, Kim, Choi, Cho, Joo & Lee (2003) identificaron los genes *lip A* y *B* de *Pseudomonas* sp. SW-3, mediante técnicas de PCR y Southern blot, que codifican una lipasa y una proteína no enzimática respectivamente. Al clonar y expresar *lipA* no presentó actividad, sin embargo, cuando ambos genes se encontraban en un mismo hospedero la lipasa fue activa, indicando que *lipB* codificaba para una proteína moduladora de la lipasa.

Wang *et al.* (2008) clonaron el gen *lip* de *Pseudomonas* sp. utilizando PCR y PCR-inversa. Primero, diseñaron cebadores a partir de regiones de mayor homología de los genes *lip*, amplificaron y clonaron los genes utilizando a *Pichia pastoris* GS115 como hospedero de expresión. De esta manera determinaron que el gen *lip* mide 1701 bp, codifica una proteína de 566 aa y 59 kDa. Esta lipasa contenía la secuencia consenso GHSLGG por lo que fue clasificada en la familia I.3. Al año siguiente Aysun (2009), clonó el gen *lip* de *Pseudomonas* sp. KE38 combinando PCR y PCR-inversa utilizando cebadores diseñados a partir de las regiones conservadas HG y el pentapéptido Gly-X-Ser-X-Gly.

Jimenez, Zavaleta, Izaguirre, Yarleque & Inga (2010) lograron aislar y caracterizar *in silico* el gen sPLA₂ que expresa una fosfolipasa A₂, a partir de una serpiente peruana *Lachesis muta*, presentando un ORF de 414 pb que codifica para una proteína de 138 aa y un péptido señal de 16 aa. El peso molecular determinado fue de 13,9 kDa. Dicho gen se logró amplificar a

partir del ARNm mediante la técnica de RT-PCR, usando primers específicos.

Pérez *et al.* (2011) identificaron, mediante librerías genéticas, una lipasa de *Marinobacter lipolyticus* SM19, la cual presenta entre 74 y 88 % de identidad con β -Lactamasas de otras especies del género *Marinobacter*, esta característica sumado a sus propiedades bioquímicas como la alta actividad hidrolítica frente a sustratos con cadenas medianas de ácidos grasos como el p-nitrofenil hexanoato, evidencian a una esterasa de la familia VIII de las lipasas. Su gen *lipBL* contiene 1215 pb con las secuencias ATG y TAA como codones de inicio y termino, respectivamente.

Messaoudi, Belguith & Hamida (2011) obtuvieron de la base de datos NCBI una lipasa de *Arabidopsis thaliana* de 379 aa y 44.23 kDa con la finalidad de generar un modelo de homología, para lo cual eligieron como molde una lipasa humana con 32% de identidad. La estructura fue validada y sometida al análisis de acoplamiento molecular identificando dos bolsillos de interacción con los sustratos ensayados.

Sangeetha, Arulpandi & Geetha (2014) utilizaron técnicas de PCR para caracterizar una lipasa resistente a proteólisis de *Bacillus pumilus* SG2, con un tamaño de 650 pb con una similitud del 99, 97 y 96 % con las lipasas de *B. pumilus* XJU, *Bacillus* sp. B26 y *B. licheniformis*, respectivamente. El gen *lip* de *B. pumilus* SG2, codifica una proteína de 209 aa.

Posteriormente, Ali *et al.* (2013) modelaron una lipasa de *Pseudomonas* sp. AMS8 de 476 aa y 50 kDa, extraída de la base de datos, en este estudio, utilizaron como posibles plantillas a las lipasas de *Serratia marcescens* (80% de identidad) y *Pseudomonas* sp. MIS38 (69% de identidad); sin embargo, sus análisis generaron un mejor modelo con la lipasa de *Pseudomonas* sp. MIS38, evidenciando que los porcentajes de identidad altos no brindan

necesariamente los mejores modelos. Por último, Gupta, Singh & Prakash, (2015) y Lanka, Talluri, Ganesh & Latha (2015), realizaron el modelamiento homólogo, la validación de la estructura y los estudios de acoplamiento de lipasas de *Pseudomonas fluorescens* y *Emericella nidulans* NFCCI 3643, respectivamente. En ambos casos, el bolsillo de interacción fue único para los sustratos ensayados.

Las investigaciones en función a las lipasas bacterianas son de importancia para incrementar los conocimientos y determinar su potencial industrial. Por ello, se siguen realizando estudios para caracterizar estas enzimas, tal es el caso de Fernández-Jerí, Zavaleta, Alejandro-Paredes & Izaguirre (2013); Rabbani *et al.* (2015) y Saengsanga, Siripornadulsil W. & Siripornadulsil S. (2016) cuyos estudios presentan características bioquímicas de lipasas versátiles a procesos salinos, termoalcalinos y alcalinos, respectivamente. Sin embargo, aún no se han descrito los genes implicados en la expresión de estas enzimas.

2.3 BASES TEÓRICAS

2.3.1. Importancia de las enzimas en la industria

Las enzimas, también conocidas como catalizadores biológicos, cumplen diversas funciones biológicas en los organismos. Siendo utilizadas por las industrias para la obtención de productos comerciales. Una de las primeras aplicaciones fue un detergente desarrollado mediante enzimas aisladas en 1914. Su producción a gran escala, a partir de microorganismos, empezó en los años 60, brindando excelentes resultados en las industrias: alimentaria, farmacéutica, textilera, papelera, cosmética y en detergentes (Houde, Kademi & Lebranc, 2003). Las fuentes de éstas enzimas son los

microorganismos, animales y vegetales, sin embargo, la mayoría de enzimas industriales son productos de procesos fermentativos (Louwrier, 1998)

Hasta la fecha se han aislado y caracterizado más de 2000 enzimas con diferentes actividades. Estos estudios son apoyados por análisis genómicos usando programas bioinformáticos que permiten caracterizar las enzimas de un organismo a nivel estructural.

La Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB, *Internacional Union of Biochemistry and Molecular Biology*) clasifica a las enzimas en 6 grandes grupos, según la reacción química que catalizan:

- Oxidoreductasas : Catalizan oxidación o reducción.
- Transferasas : Catalizan transferencia de grupos.
- Hidrolasas : Catalizan la hidrólisis de enlaces.
- Liasas : Eliminan grupos de sus sustratos.
- Isomerasas : Catalizan reordenamientos naturales.
- Ligasas : Catalizan la unión de dos moléculas.

Cabe resaltar que solo un número limitado de todas las enzimas conocidas son comercialmente disponibles, y que más del 75% de enzimas de uso industrial son del tipo hidrolasas. El 2017 la BCC (*Business Communications Company, Inc.*), reportó que el mercado global para enzimas industriales tuvo un movimiento \$4.6 y \$4.9 billones de dólares en el 2014 y 2015, respectivamente, con una proyección de crecimiento entre \$5.0 y \$6.3 entre el 2016 y 2021.

2.3.2. Lipasas microbianas y su potencial biotecnológico

Las lipasas (EC 3.1.1.3) forman parte de la familia de hidrolasas que actúan en la ruptura de los enlaces éster. La actividad principal de las lipasas es hidrolizar los triglicéridos hasta diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos y glicerol. De todas las enzimas, las lipasas también catalizan reacciones de esterificación, interesterificación y transesterificación en medios no acuosos (Houde *et al.*, 2003). Estas enzimas son usadas en las industrias: a) Oleoquímica, en la transesterificación de aceites económicos; producción de polímeros biodegradables, como el 1-Butil oleato a partir de butanol y ácido oleico; detergentes, para diferentes propósitos; b) alimentaria, en la interesterificación de grasas y aceites que aceleran la maduración de queso y facilitan la lipólisis de mantequillas, grasas y cremas; c) farmacéutica, en la formulación de productos digestivos, activadores de factores de necrosis tumoral, en la síntesis de agentes terapéuticos como el ibuprofeno; d) cosmética y perfumes, en la producción de surfactantes y aromas; bioremediación y biodegradación de residuos en efluentes y en la síntesis de biocombustibles. Las lipasas también son utilizadas en las industrias de cueros, papelera y textilera (Houde *et al.*, 2003; Schiraldi, Giuliano & De Rosa, 2002; Hasan, Shah & Hameed, 2006; Wang, Guo, Yu & Jia, 2008; Monsia & Monsia, 2013).

Si bien las lipasas pertenecen a un mismo grupo de enzimas, estas no presentan necesariamente los mismos residuos aminoacídicos, sus propiedades dependen de la fuente de donde provienen. Así por ejemplo, Hasan *et al.*, 2006 reportaron microorganismos que producen lipasas de diferentes tipos, destacando los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Penicillium* y *Aspergillus* (Hasan *et al.*, 2006).

2.3.3. Clasificación de lipasas bacterianas

Jaeger, Dijkstra & Reetz (1999) realizaron la primera clasificación de lipasas bacterianas a partir de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de proteínas, disponibles en bases de datos hasta el año 1998, ellos reportaron 6 familias de lipasas. El mismo año, Arpigny & Jaeger (1999) publicaron una nueva clasificación, basada en la comparación de secuencias de aminoácidos y algunas propiedades biológicas fundamentales, esta nueva clasificación resulto en la identificación de 8 familias diferentes.

La familia I o de las verdaderas lipasas se encuentra distribuida en 6 subfamilias diferentes. Las subfamilias I.1 y I.2 (Figura N° 1), descrito por primera vez en *Pseudomonas*. Las lipasas se encuentran codificadas en el mismo operón junto con su chaperona intramolecular (Jaeger, Ransac, Dijkstra, Colson, Heuvel & Misset, 1994), estas lipasas utilizan la vía de secreción tipo II. Mientras que la subfamilia I.3 usa la vía de secreción tipo I y tienen mayor peso molecular que las subfamilias I.1 y I.2. Las lipasas de *Bacillus*, agrupada en la subfamilia I.4 son las más pequeñas conocidas con un peso molecular aproximado de 19,6 kD (Arpigny & Jaeger, 1999).

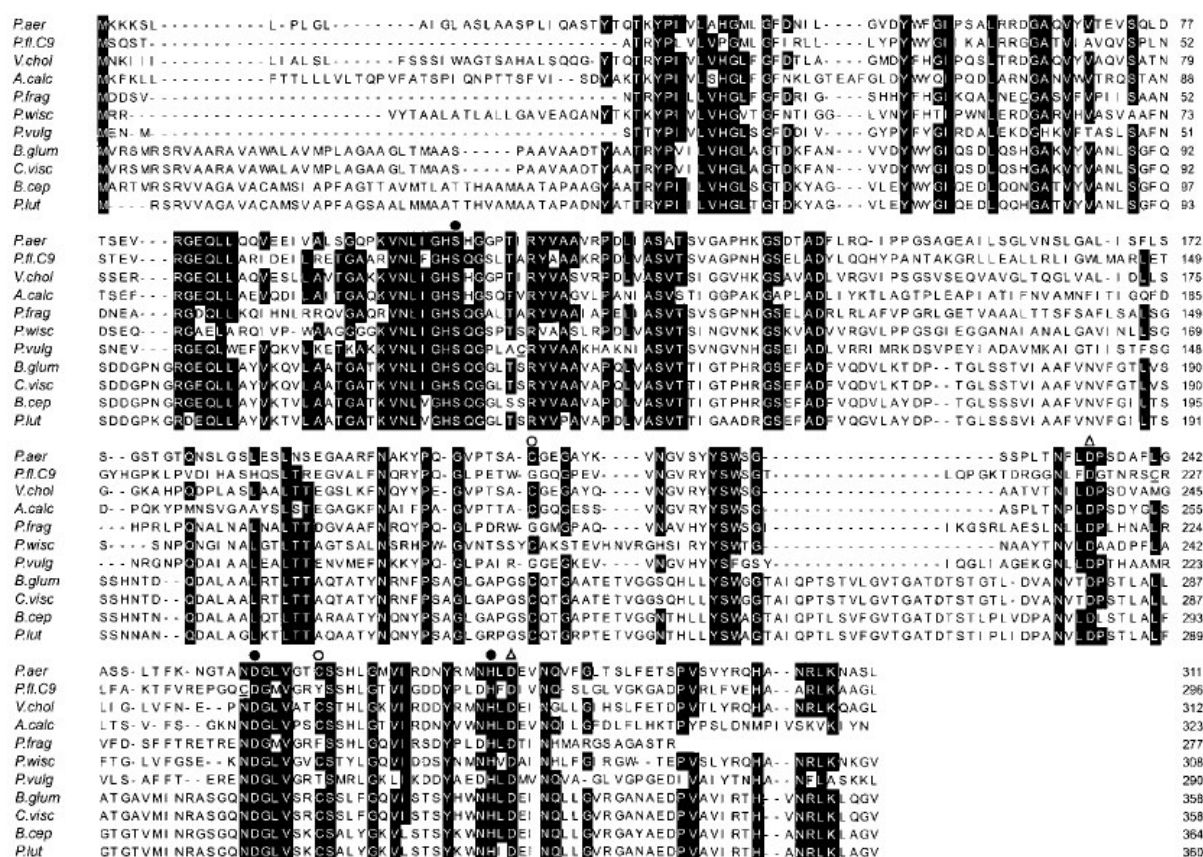


Figura N° 1. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de lipasas bacterianas, de las subfamilias I.1 y I.2. En negrita se observan las regiones conservadas entre las secuencias. Los círculos negros representan los aminoácidos de la triada catalítica; los círculos blancos son los residuos de cisteína que van a formar el puente disulfuro; los triángulos son los aminoácidos implicados en el sitio de unión al Ca^{++} .

Imagen tomada de Arpigny & Jaeger (1999).

La familia II o GDSL se caracteriza por tener actividad esterasa sin el pentapéptido conservado GX SXG, en su lugar se encuentra una secuencia de Gly-Asp-Ser-(Leu) ó GDS(L) (Figura N° 2.), conteniendo en su sitio activo un residuo de serina (Arpigny & Jaeger, 1999).

La familia III fue descrita por primera vez por Cruz *et al.*, 1994 en las especies *Streptomyces* spp y *Moraxella* sp., las lipasas son extracelulares Cruz, Pérez, Wellington, Castro & Servín-González, 1994).



Figura N° 2. Vista parcial de las secuencias conservadas en la familia II. Los círculos negros representan los residuos de la triada catalítica; el círculo blanco indica un residuo de aspartato (Asp) del sitio activo, propuesto por Brumlik y Buckley, 1996 para la lipasa de *Aeromonas hydrophila* (Brumlik & Buckley, 1996).

Imagen tomada de Arpigny & Jaeger (1999).

La familia IV o HSL (Figura N° 3), posee secuencias de aminoácidos parecidos a las de lipasas sensibles a hormonas (hHSL) de mamíferos (Langin, Laurell, Holst, Belfrage & Holm, 1993; Hemilä, Koivula & Palva, 1994). En un inicio se consideró que las regiones conservadas reflejaban la adaptación de estas proteínas al frío, por ser encontradas en bacterias psicrófilas, sin embargo las similitudes de secuencias entre esterasas de psicrófilos, termófilos y mesófilos indican que la adaptación a la temperatura no se correlaciona con las regiones conservadas en esta familia (Arpigny & Jaeger, 1999). Las regiones conservadas de este grupo son el pentapéptido GDSAG, cerca de la región N-terminal, y el motivo HGGG.

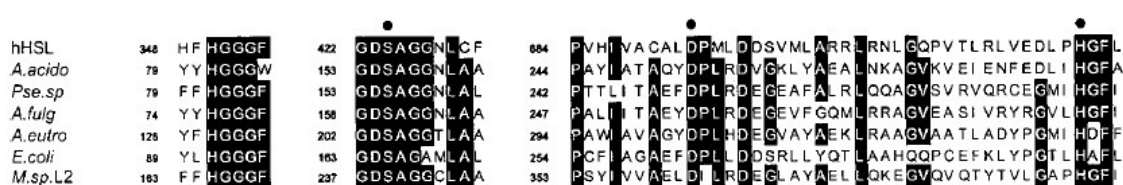


Figura N° 3. Alineamiento de secuencias pertenecientes a la familia IV. La primera secuencia pertenece a una lipasa sensible a hormonas. Los círculos negros representan los residuos del sitio activo. A la izquierda se observa el motivo HGGG y cadena arriba el pentapéptido GDSAG. Imagen tomada de Arpigny & Jaeger (1999).

La familia V, también conocida como proteínas parecidas a la familia HSL (Figura N° 4.a), poseen poca similitud de secuencias aminoacídicas, y se pueden encontrar enzimas no lipolíticas, como las epoxihidrolasas, dehalogenasas y haloperoxidasas (Verschuere, Seljée, Rozeboom, Kalk &

Dijkstra, 1993; Misawa *et al.*, 1998). Sin embargo, poseen el típico pliegue α/β hidrolasa y la triada catalítica. Un ejemplo de esta familia son las PHA y PHB depolimerazas de *Marinobacter* (Kasuya, Takano, Tezuka, Hsieh, Mitomo & Doi, 2003).

La familia VI, agrupa esterasas de bajo peso molecular identificadas a partir del genoma de *Synechocystis* sp., *Chlamydia trachomatis* y de la estructura cristalográfica tridimensional de la carboxilesteraza de *Pseudomonas fluorescens* (Kim, Song, Shin, Hwang & Suh, 1997). También poseen el pliegue α/β hidrolasa y una triada catalítica Ser-Asp-His. Una característica de estas enzimas es la similitud de secuencias del 40 % con las fosfolipasas A₂ Ca⁺⁺ independientes de eucarióticas (Figura N° 4.b).



Figura N° 4. Alineamiento de secuencias de las familias V y VI. Los círculos negros representan los residuos que conforman el sitio activo de las enzimas. En a) se observa a la familia V, siendo el primer microorganismos del alineamiento *Pseudomonas oleovorans* en cual sintetiza para una PHA depolimeraza. En b) se encuentra la familia VI, el 40% de aminoácidos son similares con fosfolipasa A₂ Ca⁺⁺ independiente (Datos no mostrados).

Imagen tomada de Arpigny & Jaeger (1999).

La familia VII presenta esterasas con secuencias aminoacídicas homologas a colinesterasas eucarióticas y a carboxilesterasas del intestino e hígado. La bacteria representante que posee esta proteína es *Arthrobacteroxydans*, en el cual sus genes de esterasas son de origen plasmídico (Arpigny & Jaeger, 1999).

La familia VIII posee similitudes de aminoácidos con las β -Lactamasas de clase C, inclusive el sitio activo de ambas enzimas son parecidas al motivo conservado en la región N-terminal Ser-Xaa-Xaa-Lys. Sin embargo, se necesita de información estructural (cristalografía) para poder confirmar la secuencia del sitio activo de esta familia (Arpigny & Jaeger, 1999).

2.3.4. Estructura de las lipasas bacterianas

Las secuencias de aminoácidos en las verdaderas lipasas no son muy conservadas entre géneros y especies, sin embargo existen algunas características particulares en su estructura primaria. Estas enzimas presentan una triada catalítica compuesta por serina (Ser), asparagina (Asp) e histidina (His), donde la serina está en el pentapéptido conservado Gly-X-Ser-X-Gly; La región del agujero oxianión, se encuentra constituida por la secuencia His-Gly en una posición de 70 a 100 aa aproximadamente antes del pentapéptido. Por último, la secuencia señal está localizada entre 10 a 40 aa por encima de la secuencia His-Gly (Kim, Jung, Choi, Ryu, Oh & Lee, 2004).

Las lipasas y otras enzimas como la acetilcolinesterasa, dienolactona hidrolasa y la serin carboxipeptidasa, poseen el mismo patrón de enrollamiento, posiblemente porque todas ellas catalizan reacciones de hidrólisis. Este patrón fue nombrado por Ollis, Shea, Cygler, Dijkstra & Frolow, (1992) como “plegamiento α/β hidrolasa”, el cual tiene generalmente ocho cadenas β hoja plegada siendo la segunda antiparalela. En las especies de *Bacillus glumae*, *Bacillus cepacea* y *Chomobacterium viscosum* se describe que las hojas β 3 hasta la β 8, son paralelas y se encuentran en la región central con plegamientos α/β (Lang, Hofmann, Haalck, Hecht & Spener, 1996; Kim, Song, Shin, Hwang & Choe, 1997).

De manera similar, la carboxilesterasa de *Pseudomonas fluorescens* contiene 7 hojas β plegadas y la lipasa de *Streptomyces exfoliatus* posee una hoja β antiparalela adicional. La lipasa de *Pseudomonas aeruginosa* y la de *Bacillus cepacea* tienen una similitud de aminoácidos del 60 %, debido a que pertenecen a la Familia I.1 y I.2, respectivamente (Kim *et al.*, 1997).

2.3.5. Estructura génica de las lipasas

A nivel nucleotídico, las lipasas verdaderas presentan similitudes variables desde 13 % hasta 95 %. Sin embargo, tienen secuencias consenso como los dominios de unión al sustrato, región que codifica para el pentapéptido Gly-X-Ser-X-Gly, y las regiones que codifican para los otros dos aminoácidos de la triada catalítica); la secuencia His-Gly, el cual constituye el agujero del oxianión en la estructura tridimensional de la proteína (Kim *et al.*, 2004) y la secuencia Shine-Dalgarno (Oshima-Hirayama, Yoshikawa, Nishioka & Oda, 1993; Wohlfarth, Hoesche, Strunk & Winkler, 1992).

2.3.6. Programas bioinformáticos utilizados para el análisis *in silico*

BLAST (Altschul, Gish, Miller, Myers & Lipman, 1990). Por sus siglas en ingles “Basic local alignment search tool”, esta herramienta permite realizar alineamientos locales de secuencias de ADN, ARN o proteínas, y compararlos con toda una base de datos. Se encuentra disponible en la página de la “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), con el enlace <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.

ClustalX (Thompson *et al*, 1997). Es un programa bioinformático que puede ser utilizado en la plataforma de Windows. Posee herramientas integradas para el alineamiento de múltiples secuencias. El programa permite cortar y pegar secuencias, así como cambiar el orden en el alineamiento. También se encuentra disponible para Linux y Mac, en la siguiente dirección electrónica <http://www.clustal.org/>.

Bioedit (Hall, 1999). Es un editor de alineamientos de secuencias biológicas, utilizada en Windows. Su interface permite la manipulación de secuencias, de forma sencilla. Este programa permite realizar alineamientos, mapas de restricción, comparar moléculas de ARN, modificar alineamientos, traducir secuencias de ácidos nucleicos, entre otras aplicaciones. Se encuentra disponible en la siguiente dirección: <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>.

DAMBE (Xia, 2013). Por sus iniciales en inglés “Data Analysis in Molecular Biology and Evolution”. Es un programa integrado para convertir, manipular, describir estadística y gráficamente, y analizar datos de secuencias moleculares. <http://dambe.bio.uottawa.ca/software.asp>.

MEGA (Tamura, Petersen D., Petersen N., Stecher, Nei & Kumar, 2011). Es un programa integrado para analizar secuencias alineadas, inferir árboles filogenéticos, estimar tasas de evolución molecular, inferir secuencias ancestrales y probar hipótesis de evolución. En biología es usado para reconstituir las historias evolutivas de especies y deducir las fuerzas naturales de selección que inducen a la evolución de genes y especies. Disponible en plataformas como Windows, Linux y Mac, se encuentra en la siguiente dirección <http://www.megasoftware.net/>.

Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012; Koressaar & Remm, 2007). Es un programa gratuito online, el cual es usado para diseñar cebadores para PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), posee diferentes parámetros controlables por el usuario, para obtener buena calidad del cebador. Esta herramienta también permite realizar pruebas de hibridación. <http://frodo.wi.mit.edu/>.

Discovery Studio 2017 R2 (Dassault Systèmes BIOVIA, San Diego, CA, USA). Herramienta utilizada para visualizar estructuras tridimensionales e interacciones moleculares, de libre distribución. Puede ser descargada para Windows y Linux de la siguiente dirección: <http://accelrys.com/>

Swiss-PDB Viewer (Guex & Peitsch, 1997) Programa con una interface amigable, permite el análisis de varias proteínas al mismo tiempo. Las proteínas pueden ser superpuestas para deducir sus estructuras y comparar sus sitios activos. Este programa trabaja en conjunto con el servidor Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>), para realizar modelamientos en modo automático y alineamiento. Se encuentra disponible en la dirección <http://spdbv.vital-it.ch/>.

RAMPAGE. Es una herramienta que sirve para evaluar los giros de Ramachandran que tienen los aminoácidos, dentro de una proteína en su estructura terciaria. Se encuentra disponible *on line* dentro de la página del departamento de bioquímica (Universidad de Cambridge) con el siguiente enlace: <http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>.

Verify 3D (Bowie, Lüthy & Eisenberg, 1991; Lüthy, Bowie & Eisenberg, 1992). Permite análisis de compatibilidad de un modelo atómico en 3D con la secuencias de aminoácidos en 1D. Es una herramienta *on line* y se encuentra dentro de la página del instituto de genómica y proteómica de la

Universidad de California – Los Angeles (UCLA). <http://www.doe-mpi.ucla.edu/>.

ERRAT (Colovos & Yeates, 1993). Verifica las estructuras protéicas determinadas por cristalografía. Es una herramienta *on line* y se encuentra dentro de la página del instituto de genómica y proteómica de la Universidad de California – Los Angeles (UCLA). <http://www.doe-mpi.ucla.edu/>.

HEX (Ritchie, Kozakov & Vajda, 2008). Programa que permite realizar superposición molecular y acoplamiento proteico. Puede leer estructuras en formato *.PDB y moléculas pequeñas en archivos *.SDF. Disponible para Windows, Linux y Mac, en la dirección <http://hex.loria.fr/>.

III. METODOLOGÍA

3.1. CULTIVO DE *Marinobacter* sp. LB

La cepa de *Marinobacter* sp. LB se cultivó en agua de sales (SW) al 3 % (Anexo N° 1) enriquecido con extracto de levadura (Oxoid) 0,5 %, recomendado para la mayoría de microorganismos halófilos. La muestra se incubó a 37 °C por 12 horas.

3.2. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

En la obtención del ADN genómico se utilizó 1,5 mL de cultivo fresco de 12 h, las células se concentraron por centrifugación a 10000 rpm por 10 min. La biomasa se lavó con 200 µL de tampón fosfato salino conteniendo NaCl 3 % para luego centrifugar la muestra a 12000 rpm por 10 min, este procedimiento se realizó por triplicado. Para lisar las membranas celulares, se adicionaron 200 µL de agua bidestilada. Luego, la muestra se colocó sobre baño de agua a 100 °C por 10 min, después se sometió a -20 °C por 2 min. Finalmente, se centrifugó a 12000 rpm por 10 min. El sobrenadante, conteniendo el ADN se separó y conservó a -20 °C hasta su uso.

Para verificar la concentración y la integridad del ADN genómico, se realizó una electroforesis en gel de agarosa (Biorad) 1 % con tampón TAE (Tris, acetato, ácido *etilen*-diamino-tetra-acético) 1 X y como marcador de peso molecular *DNA Ladder* 1 kb (Invitrogen). Las condiciones de electroforesis fueron 80 V por 30 min. El ADN se coloreó con bromuro de etidio (Amresco) 10 µg/mL y se observó en un transiluminador UV.

3.3. AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES RIBOSÓMICOS 16S DE *Marinobacter* sp. LB

La amplificación de los genes ribosómicos 16S se realizó utilizando los cebadores universales para bacterias 16SBF 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' y 16SBR 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó con un volumen final de 25 μ L, la mezcla de reacción contenía: KCl 50 mM; Tris / HCl 10 mM; tritón X-100 0,1 % (v/v); MgCl₂ 1,5 mM; dNTPs 200 μ M; 20 pmoles de cada cebador; *Taq* ADN-polimerasa 1 U y ADN genómico 50 ng.

La PCR se inició con una desnaturalización del ADN genómico a 94 °C por 4 min seguido por 35 ciclos repetitivos a 94 °C por 45 s, 55 °C por 60 s y 72 °C por 45 s, con una extensión final a 72 °C por 7 min.

La verificación de los productos amplificados se realizó por electroforesis en gel de agarosa 1 % con tampón TBE 0,5X (Tris, borato, ácido *etilen*-diamino-tetra-acético). El marcador de peso molecular fue *DNA Ladder* 1 kb. Los ADNs se tiñeron utilizando bromuro de etidio 10 μ g/mL y se observaron a través de un transiluminador UV.

3.4. AMPLIFICACIÓN DEL GEN *glut* DE *Marinobacter* sp. LB

La amplificación del gen *glut* se realizó utilizando cebadores específicos. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó con un volumen final de 25 μ L, la mezcla de reacción contenía: KCl 50 mM; Tris / HCl 10 mM; tritón X-100 0,1 % (v/v); MgCl₂ 1,5 mM; dNTPs 200 μ M; 20 pmoles de cada cebador; *Taq* ADN-polimerasa 1 U y ADN genómico 50 ng.

La PCR se inició con una desnaturalización del ADN genómico a 94 °C por 4 min seguido por 35 ciclos repetitivos a 94 °C por 45 s, 45 °C por 60 s y 72 °C por 45 s, con una extensión final a 72 °C por 7 min.

La verificación de los productos amplificados se realizó por electroforesis en gel de agarosa 1 % con tampón TBE 0,5X (Tris, borato, ácido *etilen*-diamino-tetra-acético). El marcador de peso molecular fue *DNA Ladder* 1 kb. Los ADNs se tiñeron utilizando bromuro de etidio 10 µg/mL y se observaron a través de un transiluminador UV.

3.5. DISEÑO DE CEBADORES PARA EL GEN *lip*

Debido a la escasa información acerca del gen *lip* del género *Marinobacter*, se diseñaron cebadores a partir de secuencias conservadas en regiones internas y externas del gen *lip*, extraídas del genoma de *Marinobacter algicola* (DG893), *Marinobacter adhaerens* (Marine bacterium HP15) y *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (ATCC49840).

Los cebadores utilizados para la amplificación del gen *lip* de *Marinobacter* sp. LB fueron diseñados *on line* con el programa PRIMER3 (Untergasser *et al.*, 2012; Koressaar & Remm, 2007). Los cebadores diseñados fueron contrastados con alineamientos de los genes de lipasas, para descartar aquellos que no esten en regiones conservadas del gen *lip*.

3.6. AMPLIFICACIÓN DEL GEN *lip* MEDIANTE PCR

El gen *lip* se amplificó utilizando como molde el ADN genómico de *Marinobacter* sp. LB, aislado de las Salinas de Pilluana, mediante PCR utilizando los cebadores diseñados. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó con un volumen final de 25 μ L, la mezcla de reacción contenía: KCl 50 mM; Tris / HCl 10 mM; tritón X-100 0,1 % (v/v); MgCl₂ 1,5 mM; dNTPs 200 μ M; 20 pmoles de cada cebador; *Taq* ADN-polimerasa 1 U y ADN genómico 50 ng.

La PCR se inició con una desnaturalización del ADN genómico a 94 °C por 4 min seguido de 35 ciclos repetitivos a 94 °C por 45 s, 45 °C por 55 s y 72 °C por 45 s, con una extensión a 72 °C por 7 min.

La verificación de los productos amplificados se realizó por electroforesis en gel de agarosa 1 % con tampón TBE 0,5X (Tris, borato, ácido *etilen*-diamino-tetra-acético). El marcador de peso molecular fue *DNA Ladder* 1 kb. Los ADNs se tiñeron utilizando bromuro de etidio 10 μ g/mL y se observaron a través de un transiluminador UV.

3.7. SECUENCIACIÓN DE LOS GENES RIBOSÓMICOS 16S, *glut* Y *lip* DE *Marinobacter* sp. LB

Los genes 16S, *glut* y *lip* de *Marinobacter* sp. LB se secuenciaron por servicios en la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

3.8. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS GENES RIBOSÓMICOS 16S DE *Marinobacter* sp. LB

Las secuencias de los genes ribosómicos 16S fueron comparadas con la base de datos del GenBank, mediante la aplicación BlastN (Altschul *et al.*, 1990), obteniendo de esta manera secuencias relacionadas con la especie en estudio, también se utilizaron cepas de referencia del género *Marinobacter*.

Con el conjunto de secuencias se procedió a realizar el alineamiento múltiple con el programa ClustalX (Thompson *et al.*, 1997). Con este mismo programa, se cortó las secuencias para obtener una región uniforme. El alineamiento se analizó y corrigió manualmente con el programa Bioedit (Hall, 1999) con la finalidad de obtener mayor cantidad de sitios conservados. La calidad de las secuencias se verificó mediante el programa DAMBE (Xia, 2013).

En el análisis filogenético de especies de *Marinobacter* se empleó el programa Mega 5,1 (Tamura *et al.*, 2011). Se elaboraron tres árboles filogenéticos utilizando los métodos: Neighbor-Joining (NJ), con Jukes-Cantor como modelo de sustitución nucleotídica; Maximum Parsimony (MP), tomando como algoritmo de búsqueda *Min-Mini Heuristic*; Por último, Maximum Likelihood (ML), se utilizó como modelo de sustitución nucleotídica y método heurístico a Tamura-Nei y Nearest-Neighbor-Interchange, respectivamente, con la finalidad de probar la similitud de los árboles. En todos los casos se evaluó las consistencias con bootstraps de 1000 replicaciones y no se tomó en cuenta los gaps o datos perdidos.

Para identificar la especie de la cepa, se realizaron análisis filogenéticos adicionales dentro de la especie *Marinobacter*

hidrocarbonoclasticus, para lo cual se empleó los mismos parámetros bioinformáticos mencionados anteriormente, con la modificación de las secuencias nucleotídicas.

3.9. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DEL GEN *glut* de *Marinobacter* sp. LB

El gen *glut* que codifica para la subunidad mayor del glutamato sintetasa, se utilizó como un marcador adicional para la verificación de la filogenia de *Marinobacter* sp. LB aislado de las salinas de Pilluana. En este sentido el análisis filogenético se realizó una búsqueda, con ayuda del BlastN (Altschul *et al.*, 1990), de secuencias cercanas con la cepa en estudio, seleccionando como grupo externo al gen *glutB* de la especie *Pseudomonas fluorescens* FW300-N2C3.

Los parámetros bioinformáticos para el alineamiento, edición, verificación de la calidad y análisis filogenético fueron los mismos que se utilizaron en el análisis de los genes ribosómicos 16S.

3.10. ANÁLISIS EVOLUTIVO DEL GEN *lip* DE *Marinobacter* sp. LB

La secuencia de nucleótidos del gen *lip* fue comparada con los datos del GenBank usando el programa BLASTN (Altschul *et al.*, 1990) y así las secuencias de genes de lipasas con mayor porcentaje de similitud fueron seleccionadas.

El alineamiento, edición y verificación de la calidad de las secuencias fueron realizadas según lo mencionado en los análisis de los genes, ribosómicos 16S y *glut*. Para el análisis evolutivo se realizaron tres árboles

con bootstraps de 1000 replicaciones cada uno, los parámetros de cada árbol fueron los siguientes: Neighbor-Joining (NJ), con Poisson model como modelo de sustitución; Maximum Parsimony (MP), tomando como algoritmo de búsqueda *Min-Mini Heuristic*. Por ultimo, Maximum Likelihood (ML) fue utilizado como modelo de sustitución y método heurístico a Jones-Taylor-Thornton y Nearest-Neighbor-Interchange, respectivamente con la finalidad de probar la similitud de los árboles.

3.11. ANÁLISIS *in silico* DE LA ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA LIPASA DE *Marinobacter* sp. LB

Para agilizar el proceso de transcripción del ADN y traducción del transcripto, se utilizó el programa Bioedit (Hall, 1999), utilizando como secuencia molde del gen *lip* de *Marinobacter* sp. LB.

Posteriormente se realizó un alineamiento de aminoácidos de lipasas de la Familia I subfamilia 1 y 2, según lo descrito por Arpigny & Jaeger (1999), a la cual se incluyeron cepas del género *Marinobacter*. Este proceso se realizó para: Verificar la familia a la que pertenece el producto de los genes *Lip* del género *Marinobacter*; elucidar las regiones conservadas dentro de las proteínas y ubicar los aminoácidos conservados, tales como histidina, ácido aspártico y serina, pertenecientes a la triada catalítica de la enzima.

Una vez obtenida la secuencia de aminoácidos de la Lipasa, se identificó la presencia de puntos de escisión dentro del péptido señal, con ayuda del programa SignalP (Petersen, Brunak, Heijne & Nielsen, 2011), tomando en cuenta que *Marinobacter* sp. LB es una bacteria Gram negativa y que su lipasa es una enzima extracelular (Chavez, 2010; Alejandro-Paredes 2012).

3.12. ANÁLISIS *in silico* DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA Y TERCIARIA DE LA LIPASA DE *Marinobacter* sp. LB

3.12.1. Selección de la estructura molde

Para un adecuado modelamiento de la lipasa de *Marinobacter* sp. LB se realizó un alineamiento local de aminoácidos entre la secuencia de la lipasa de *Marinobacter* sp. LB (secuencia blanco) y las bases de datos: *Protein Data Bank* (PDB) y *UniProtKB*. La secuencia escogida como molde fue la lipasa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, codificada como 1EX9 (secuencia plantilla).

3.12.2. Modelamiento homólogo

El modelo de homología se construyó utilizando la versión de Swiss-PDB Viewer 4.0.4 (Guex & Peitsch, 1997). Esta aplicación proporciona un interfaz de fácil acceso para el usuario el cual permite analizar la estructura tridimensional de las proteínas. El modelado de homología se basa en la identificación de una o más estructuras de proteínas conocidas que pueden parecerse a la estructura de la “secuencia blanco” y en la producción de una alineación que mapea residuos similares entre la “secuencia blanco” y la “secuencia plantilla”. El programa permite realizar tres tipos de modelado: Modo automatizado, donde la similitud entre la secuencia blanco y la plantilla es muy alta; modo de alineación, compara varias alineaciones alternativas y evaluar la calidad de los modelos resultantes; modo proyecto, permite la inspección visual y la manipulación manual de la alineación mejorando la calidad del modelo resultante. Asimismo, se calculó la raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) con el mismo programa para evaluar la confiabilidad de la estructura modelada.

Para obtener la estructura modelada de la lipasa de *Marinobacter* sp. LB se utilizó el modo de proyecto. En donde se alinea la “secuencia blanco” con la “plantilla”, la edición del alineamiento se realizó dentro del mismo programa y posteriormente se superpuso la secuencia de aminoácidos de la lipasa en estudio sobre la estructura molde de lipasa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (1EX9).

El programa Swiss-PBD Viewer 4.0.4 (Guex & Peitsch, 1997) también permite identificar las estructuras secundarias tales como laminas- β y las α -hélices presentes en la lipasa de *Marinobacter* sp. LB.

3.12.3. Validación del modelamiento

El estructura de la lipasa de *Marinobacter* sp. LB fue sometida al proceso de validación que se realizó para verificar que el modelado de la lipasa cumple con los requisitos mínimos de calidad. En consecuencia, el modelo fue sometido a los análisis de: evaluación de la calidad estereoquímica de los puntos de Ramachandran, con el programa RAMPAGE (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>); evaluación del entorno de los aminoácidos considerando la calidad de la estructura proteica, con Verify 3D (Bowie *et al.* 1991, Lüthy *et al.* 1992) y análisis de las regiones plegadas, utilizando ERRAT (Colovos & Yeates, 1993). Los dos últimos programas estuvieron en el servidor del Instituto DOE de la Universidad de California, Los Ángeles (<http://www.doe-mbi.ucla.edu/>).

3.12.4. Acoplamiento molecular

Con la finalidad de obtener las energías de acoplamiento y el posible modo de interacción entre la lipasa de *Marinobacter* sp. LB y tres sustratos

seleccionados, se realizó el análisis con el programa HEX 8.0.0 (Ritchie *et al.*, 2008).

El sustrato seleccionado fue tributirina (CID: 6050), extraído de la base de datos de moléculas químicas del NCBI (PubChem), por ser un lípido de sencillo y de fácil degradación por las lipasas. Los parámetros utilizados fueron predeterminados por el programa que simuló varias orientaciones posibles con sus respectivas energías de acoplamiento, brindando el modelo más viable. El tipo de correlación y la salida del post procesamiento para el receptor y el ligando se mantuvieron con base a la forma, el potencial electrostático y la minimización de la mecánica molecular (MM). El acoplamiento se llevó a cabo a rotación total del ligando manteniendo la posición del receptor fija en el espacio. Este programa fue validado reproduciendo tres modelos cristalográficos de lipasas pertenecientes a *Pseudomonas aeruginosa* (PDBID: 1EX9), *Burkholderia cepacia* (PDBID: 1YS1) y *Pseudomonas cepacia* (PDBID: 1HQD) en interacción con RC-(RP,SP)-1,2-dioctil carbamoil-glicero-3-O-octilfosfonato (CID: 445454), ácido hexilfosfónico (R)-2-metil-3-fenil propil ester (CID: 4369425) y 1-fenoxi-2-acetoxibutano (CID: 446123), respectivamente. Los acoplamientos para la validación fueron realizados retirando los sustratos de los modelos cristalográficos con ayuda del programa Swiss-PDB Viewer 4.0.4 (Guex & Peitsch, 1997) y acoplándolos nuevamente con el programa HEX 8.0.0 (Ritchie *et al.*, 2008). Además, las interacciones se analizaron con el programa Discovery Studio 2017 R2 (Dassault Systèmes BIOVIA, San Diego, CA, USA).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

4.1.1. Extracción de ADN genómico

El ADN genómico obtenido de la bacteria *Marinobacter* sp. LB por el método de choque térmico fue de buena calidad con una concentración de 500 ng/μl. (Figura N° 5). En la parte inferior de la línea M1 se observa una mancha extensa de ácidos nucleídos, que corresponden a los ARN ribosómicos, para su eliminación se requiere añadir ribonucleasas a la muestra de extracción.

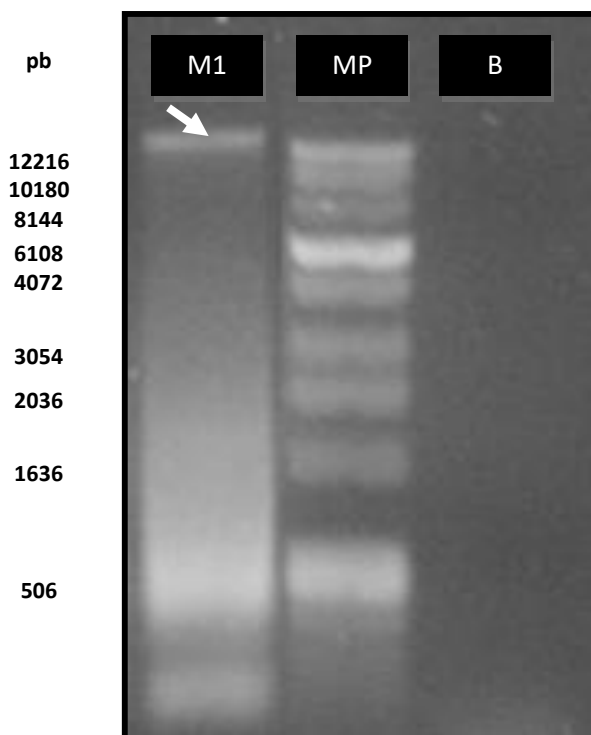


Figura N° 5. Gel de agarosa al 1 % conteniendo ADN genómico de *Marinobacter* sp. LB (flecha blanca). Líneas: M1, muestra de ADN genómico; MP, marcador de peso molecular; B, blanco.

4.1.2 Amplificación de los genes ribosómicos 16S de *Marinobacter* sp. LB

Los genes ribosómicos 16S de *Marinobacter* sp. LB, fueron amplificados por PCR usando cebadores universales. Mediante electroforesis, el producto amplificado presentó un tamaño aproximado de 1500 pb, el cual fue calculado por regresión lineal en base al marcador de peso molecular y el tamaño del gel de agarosa (Figura N° 6).

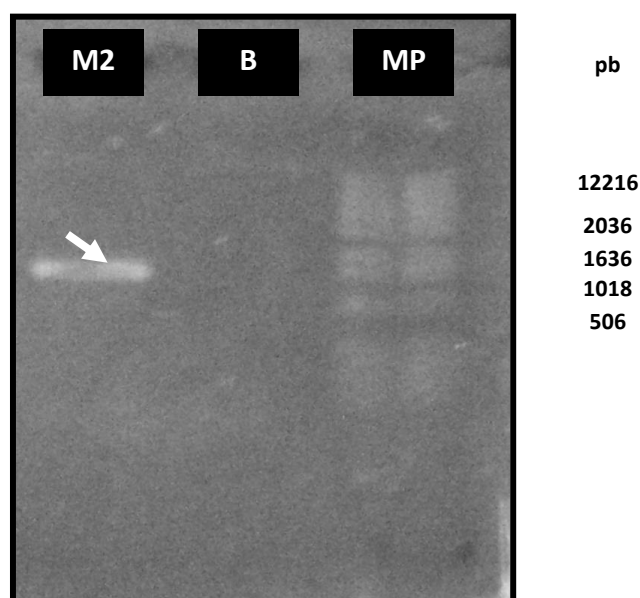


Figura N° 6. Gel de agarosa al 1 % conteniendo los genes ribosómicos 16S de *Marinobacter* sp. LB (flecha blanca). Líneas: M2, producto de PCR; B, blanco; MP, marcador de peso molecular.

4.1.3. Análisis filogenético de los genes ribosómicos 16S de *Marinobacter* sp. LB

Al comparar la secuencia de los genes ribosómicos 16S de *Marinobacter* sp. LB, con la base de datos se observó que, esta bacteria

pertenecía al género *Marinobacter*. Por lo que se obtuvieron las secuencias de los genes ribosómicos 16S de las bases de datos de libre acceso de todas las especies pertenecientes a dicho género. Con lo cual se realizaron dos árboles filogenéticos.

Para el primer árbol se utilizaron secuencias génicas de 34 especies diferentes del género *Marinobacter*, con la finalidad de identificar la especie de la cepa en estudio. Las cepas utilizadas están descritas por el *International Committee on Systematics of Prokaryotes* y como grupo externo se empleó a *Salinibacter ruber* M31. Las especies y los códigos de acceso de los genes ribosómicos 16S están detallados en la tabla N° 1.

Todas las secuencias obtenidas, incluyendo la cepa en estudio fueron sometidas a un alineamiento múltiple con el programa ClustalX (Thompson *et al*, 1997). Debido a que las muestras no presentaban un tamaño homogéneo en el número de nucleótidos, se procedió a realizar cortes en los extremos de las secuencias, obteniendo aproximadamente 1391 pb por cada una (Anexo N° 2). Con la finalidad de encontrar mayor cantidad de sitios conservados, se editó de manera manual el alineamiento con ayuda del programa Bioedit (Hall, 1999). El análisis con el programa DAMBE (Xia, 2013) indica que las muestras no presentaron problemas de saturación por las mutaciones obtenidas en el tiempo, por lo que se deduce que las muestras tienen buena calidad para continuar con el estudio. Las secuencias de los genes ribosómicos 16S de todas las especies del género *Marinobacter*, presentaron 1158 sitios conservados y 159 sitios informativos a partir de los cuales se realizaron los algoritmos para generar los arboles filogenéticos.

Tabla N° 1. Cepas utilizadas en el análisis filogenético de los genes ribosómicos 16S de *Marinobacter* sp. LB

Especies	Cepa	Código de acceso (gb)	Código de acceso (gi)
<i>Marinobacter koreensis</i>	KGB22	DQ097526.1	70727884
<i>M. algicola</i>	DG893	AY258110.2	41059917
<i>M. salsuginis</i>	SD-14	EF028328.1	121483696
<i>M. aquaeolei</i>	-	AF173969.1	9622549
<i>M. flavimaris</i>	2PR54-4	EU440995.1	167508048
<i>M. lipolyticus</i>	SM-19	NR_025671.1	219846081
<i>M. bryozorum</i>	PTG4-16	EU603452.1	183238721
<i>M. gudaonensis</i>	SL014B11A	DQ629025.1	106921842
<i>M. sediminum</i>	R65	NR_029028.1	265678723
<i>M. goseongensis</i>	En6	EF660754.1	151935539
<i>M. kribbensis</i>	Iso17	EF660753.1	151935538
<i>M. bryozorum</i>	PR53-11	EU441002.1	167508055
<i>M. hydrocarbonoclasticus</i>	P721	GU370116.1	289185521
<i>M. lacisalsi</i>	FP2.5	EU047505.1	159459964
<i>M. haloterrigenus</i>	FP2.5	DQ157009.2	194360036
<i>M. zhanjiangensis</i>	JSM078120	FJ425903.1	216362929
<i>M. lutaoensis</i>	T5054	NR_025116.1	219857528
<i>M. segnicrescens</i>	MP	EF157832.1	127905730
<i>M. guineae</i>	LGM24048	AM503093.1	189458578
<i>M. alkaliphilus</i>	2PR56-13	EU440994.1	167508047
<i>M. excellens</i>	KMM3809	NR_025690.1	219846100
<i>M. mobilis</i>	B17	GQ214550.1	242347108
<i>M. bacchus</i>	FB3	DQ282120.1	82659465
<i>M. vinifirmus</i>	FB1	DQ235263.1	81296513
<i>M. articus</i>	-	AF148811.1	4927281
<i>M. taiwanensis</i>	GI-1701	EF368020.1	125491242
<i>M. daepoensis</i>	SW-156	NR_025800.1	219846210
<i>M. szutsaonensis</i>	NTU-10	EU164778.1	158146407
<i>M. santoriniensis</i>	NKSG1	EU496088.1	187384685
<i>M. litoralis</i>	SW-45	NR_028841.1	265678537
<i>M. zhejiangensis</i>	CN74	EU293413.1	162423254
<i>M. psychrophilus</i>	BSi20041	DQ060402.2	93009050
<i>M. maritimus</i>	CK47T	AJ704395.1	47109374
<i>M. salicampi</i>	ISL-40	EF486354.1	143021264
<i>Salinibacter ruber</i>	M31	AF323500.1	12007479

Para ubicar la especie a la que pertenece la cepa en estudio, se elaboró tres arboles con los métodos Neighbor-Joining (NJ), Maximun Parsimony (MP) y Maximun Likelihood (ML) (Figura N° 7). En los tres casos la cepa aislada de las Salinas de Pilluana se encontró cercana a *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* P721 y *M. alkaliphilus* 2PR56-13. Sin embargo, los bootstraps en todos los casos fueron bajos (menos de 50 %), lo cual indica que el clado (grupo) formado no es consistente y por lo tanto no se puede determinar con precisión la especie de *Marinobacter* sp. LB.

En tal sentido se realizó un segundo análisis filogenético con especies similares a la secuencia de la cepa en estudio (según los resultados del BlastN) (Altschul *et al.*, 1990) utilizando también las dos especies relacionadas en el análisis anterior (*Marinobacter hydrocarbonoclasticus* P721 y *Marinobacter alkaliphilus* 2PR56-13). El análisis se realizó con nueve especies de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, uno de *M. alkaliphilus* 2PR56-13 y se empleó como grupo externo a *M. daeipoensis* SW-156. Las especies y los códigos de acceso de sus genes ribosómicos 16S están descritos en la tabla N° 2.

Tabla N° 2. Cepas utilizadas en el análisis filogenético de los genes ribosómicos 16S de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*.

Especie	Cepa	Código de acceso (gb)	Código de acceso (gi)
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	ATCC49840	-	381337457
<i>M. hydrocarbonoclasticus</i>	NBRC103161	AB681969.1	359805890
<i>M. hydrocarbonoclasticus</i>	NY-9	JN903903.1	355340809
<i>M. sp.</i>	EM493	GU223380.1	282153499
<i>M. hydrocarbonoclasticus</i>	MARC4F	DQ768638.1	110826246
<i>M. hydrocarbonoclasticus</i>	-	Y16735.1	4049474
<i>M. sp.</i>	CAB	U61848.1	1511642
<i>M. hydrocarbonoclasticus</i>	ss40	JN160781.1	341575739
<i>M. hydrocarbonoclasticus</i>	K-W47	JQ799097.1	385880901
<i>M. alkaliphilus</i>	2PR56-13	EU440994.1	167508047
<i>M. daeipoensis</i>	SW-156	NR_025800.1	219846210

Todas las secuencias fueron alineadas (Anexo N° 3) y cortadas en los extremos, obteniendo aproximadamente 1358 pb por cada muestra. Al igual que las secuencias anteriores se editaron y se comprobó que no tuvieran problemas de saturación. Las secuencias de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* y la cepa en estudio presentaron 1358 sitios conservados, es decir todos sus nucleótidos fueron iguales. Sin embargo, con *M. alkaliphilus* 2PR56-13 y *M. daeipoensis* SW-156 presentaron 1334 y 1326 sitios conservados, respectivamente. Del análisis se determinaron tres sitios informativos a partir de los cuales se generaron los árboles filogenéticos (Figura N° 8).

En todos los árboles filogenéticos del segundo análisis, se observó un clado diferenciado de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, dentro de la cual se encuentra la cepa *Marinobacter* sp. LB, aislada de las Salinas de Pilluana, este grupo se encuentra bien robustecido por boobstraps de 94 (NJ), 99 (MP) y 95 % (ML). La especie *M. alkaliphilus* 2PR56-13 y *M. daeipoensis* SW-156, en todos los casos se comportaron como grupos externos. La figuras N° 7 y N° 8, muestran los árboles realizados con el método *Maximum Likelihood* (ML).

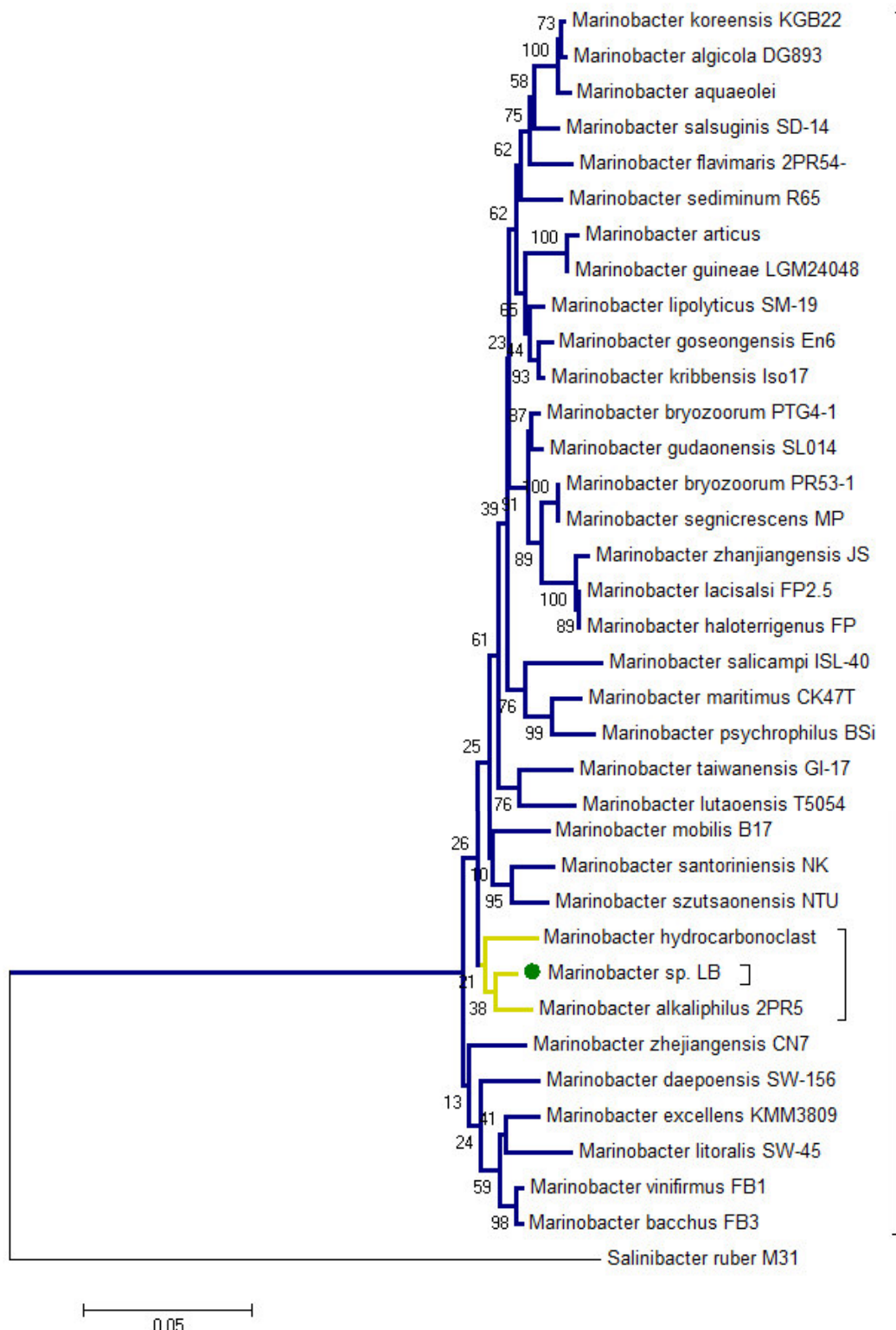


Figura N° 7. Árbol filogenético (ML) realizado con las secuencias de los genes ribosómicos 16S de las especies pertenecientes al género *Marinobacter*. Posicionamiento de *Marinobacter sp. LB* en el (●). Se utilizó a *Salinibacter ruber* M31 como grupo externo. El valor del Bootstrap fue de 1000 replicaciones y la barra de 0,05 % indica la divergencia de las secuencias.

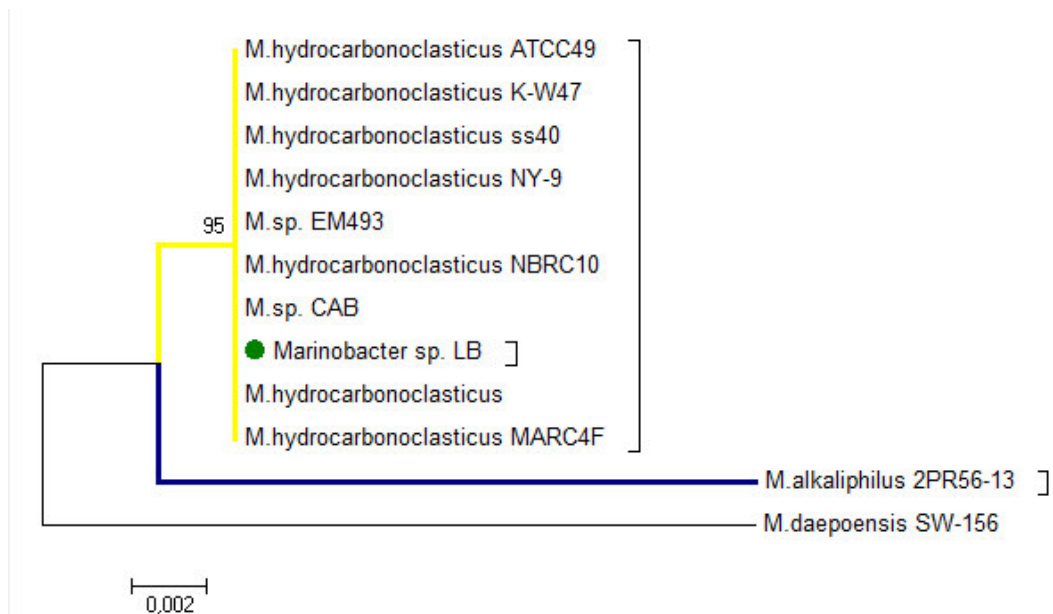


Figura N° 8. Árbol filogenético (ML) realizado con las secuencias de los genes ribosómicos 16S de especies pertenecientes a *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. Posicionamiento de *Marinobacter* sp. LB en el (●). Las especies *Marinobacter alkaliphilus* 2PR56-13 y *Marinobacter daepoensis* SW-156 se comportaron como grupos externos. El valor del Bootstrap fue de 1000 replicaciones y la barra de 0,002 % indica la divergencia de las secuencias

4.1.4. Amplificación del gen *glut* de *Marinobacter* sp. LB

Con los cebadores FglutM 5'-TACGTAGCACGGGTAAGACC-3' y RglutM 5'-GAGTTCTTCAGCGTATCTCC-3' desarrollados en el Laboratorio de Biología Molecular, se amplificaron la secuencia y luego se verificó la presencia del producto mediante electroforesis en gel de agarosa. En la figura N° 9 se puede apreciar una banda de aproximadamente 800 pb, calculado por regresión lineal.

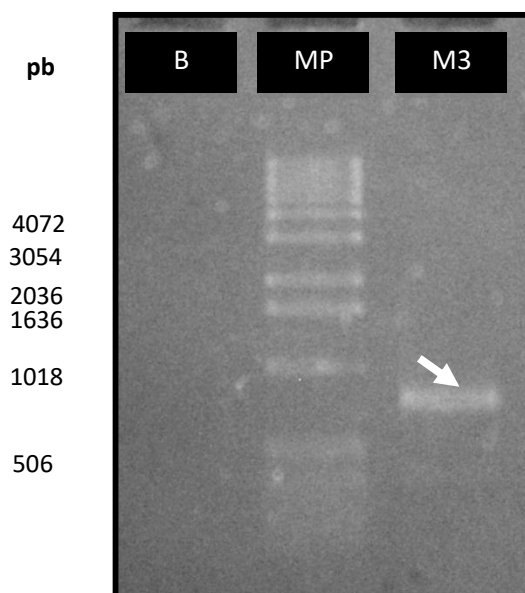


Figura N° 9. Gel de agarosa al 1 % conteniendo el gen *glutB* de *Marinobacter* sp. LB (flecha blanca). Líneas: B, blanco; MP, marcador de peso molecular (DNA Ladder 1 kb); M3, producto de PCR.

4.1.5. Análisis filogenético del gen *glut* de *Marinobacter* sp. LB

Las especies y códigos de acceso de los genes *glutB* utilizados para realizar el análisis de verificación de especie de la cepa *Marinobacter* sp. LB, se encuentran descritas en la tabla N° 3.

Tabla N° 3. Cepas del género *Marinobacter* utilizadas en el análisis filogenético del gen *glut* de *Marinobacter* sp. LB

Especie	Cepa	Código de acceso (gb)
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	ATCC49840	FO203363.1
<i>M. aquaeolei</i>	VT8	CP000514.1
<i>M. similis</i>	A3d10	CP007151.1
<i>M. adhaerens</i>	HP15	CP001978.1
<i>M. salarius</i>	R9SW1	CP007152.1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	FW300-N2C3	CP012831.1

Todas las secuencias obtenidas, incluida la de *Marinobacter* sp. LB fueron sometidas a un alineamiento múltiple y luego se realizaron cortes en los extremos de las secuencias, obteniendo aproximadamente 778 pb por cada muestra (Anexo N° 4). Posteriormente, el alineamiento se editó para encontrar mayor cantidad de sitios conservados. Las secuencias no presentaron problemas de saturación demostrando su buena calidad para los estudios filogenéticos. Los genes *glut* presentaron 268 sitios conservados y 152 sitios informativos, a partir de los cuales se realizó los tres arboles filogenéticos. Al desarrollar los arboles filogenéticos, todos agruparon a la cepa *Marinobacter* sp. LB junto con *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ATCC 49840 y *Marinobacter aquaeolei* VT8, con bootstraps de 65 (NJ), 93 (MP) y 95 % (ML), en la figura N° 10 se observa el árbol *Maximum Likelihood* (ML), cabe resaltar que el análisis del BlastN (Altschul *et al.*, 1990) demostró que éstas especies presentan un porcentaje de similitud del 96% con la cepa en estudio. El grupo externo, en los tres análisis, fue *Pseudomonas fluorescens* FW300-N2C3.

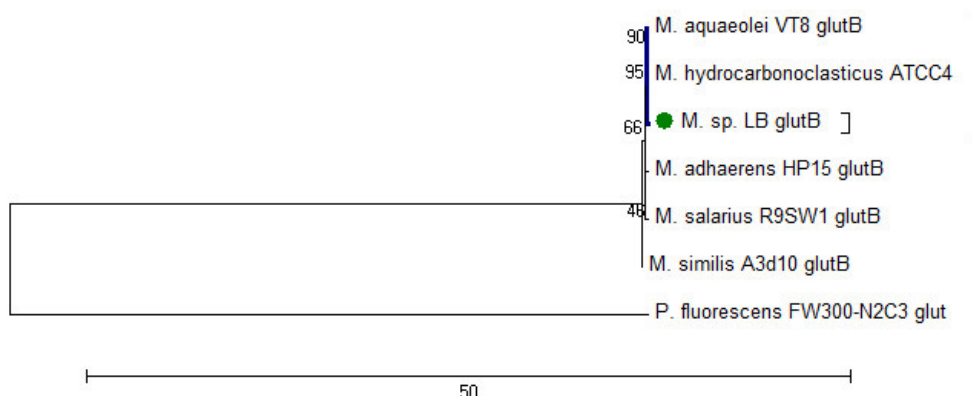


Figura N° 10. Árbol filogenético (ML) realizado con las secuencias *glut* de especies cercanas a *Marinobacter* sp. LB (●). *Pseudomonas fluorescens* FW300-N2C3 fue utilizada como grupo externo. El valor del Bootstrap fue de 1000 replicaciones y la barra de 50 % indica la divergencia de las secuencias.

4.1.6. Diseño de cebadores para el gen *lip* de *Marinobacter* sp. LB

Se desarrollaron *in silico* varios cebadores, los cuales fueron comparados con el alineamiento de los tres genes de lipasa obtenidos de las especies *Marinobacter algicola* (DG893), *Marinobacter adhaerens* (P15) y *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (ATCC49850). Posteriormente se seleccionaron aquellos cebadores que se encontraban en regiones conservadas.

De todos los cebadores diseñados solo se mandaron a sintetizar cinco posibles oligonucleótidos para la amplificación del gen *lip* de *Marinobacter* sp. LB, los cuales se encontraban en regiones internas y externas del gen, tal y como se indica en la figura N° 11. Los cebadores Mlip1 y Mlip2 se acoplan en las regiones externas; el Mlip3, se encuentra en la región interna; el Mlip4 forward y reverse se hibridan cadena arriba y en la parte interna del gen, respectivamente. Por último, el Mlip5 forward y reverse, en la parte interna y cadena abajo del gen de lipasa. El par que brindó mejor resultado en la amplificación fue el cebador Mlip2 (Tabla N° 4).

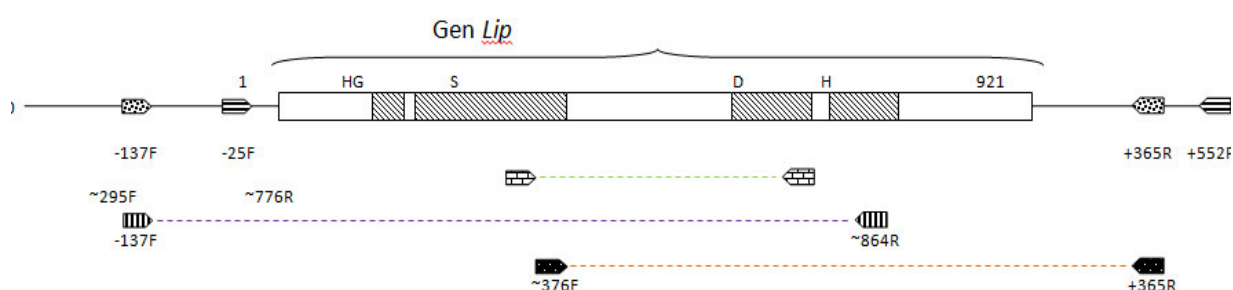







Figura N° 11. Cebadores diseñados para amplificar el gen *lip* de *Marinobacter* sp. LB, usando el programa PRIMER3 (Untergasser *et al.*, 2012; Koressaar & Remm, 2007).

Tabla N° 4. Cebadores diseñados *in silico* para la amplificación del gen *lip* de *Marinobacter* sp. LB

Símbolo	Ubicación	Secuencias		Características			
				Tamaño	%GC	Tm (°C)	Producto (pb)
	Primers externos	FMlip1	ACAACAGCAAACCTGTAGG	18	45	53,77	1497
		RMLip1	GTCTCTAACGTTGAGTGACG	20	50	53,53	
	Primers externos	FMlip2	ATACTCCCTGTTGCATGTCG	20	50	58,60	990
		RMLip2	TGGACTGGTGCTTCATAACC	20	50	58,57	
	Primers internos	FMlip3	CCACAGATCGCTTCAATC	18	50	54,96	515
		RMLip3	TTGCCAAAGTGGTTGC	16	50	54,7	
	Primers exter-inter	FMlip4	ATGTGATCAGTGTAACACC	20	45	52,69	999
		RMLip4	TCACTGCTACACCGTAAGC	19	52,63	55,55	
	Primers inter-exter	FMlip5	ATCACAAGACAGAAGTCAGC	20	45	52,69	938
		RMLip5	GGAGATACGCTGAAGAACTC	20	50	54,12	

4.1.7. Amplificación del gen *lip* mediante PCR

Se utilizaron los cinco cebadores sintetizados para la amplificación de todo o parte del gen *lip* de *Marinobacter* sp. LB mediante PCR. Sin embargo, al momento de realizar la corrida electroforética en geles de agarosa, se evidencio que solo los cebadores FMlip2 y RMLip2 amplificaron el gen (Figura N° 12), el cual midió aproximadamente 998 pb, determinado por regresión lineal a partir de las distancias recorridas por el marcador de peso molecular (Tabla N° 5).



Figura N° 12. Gel de agarosa al 1 % conteniendo el gen *lip* de *Marinobacter* sp. LB (Flecha blanca) amplificado por PCR, utilizando los cebadores Mlip2 forward y reverse. Líneas: B, blanco; MP, marcador de peso molecular.

Tabla N° 5. Datos de la regresión lineal para determinar el tamaño experimental del gen *lip* de *Marinobacter* sp. LB utilizando electroforesis.

Fragmento de ADN	Tamaño	Distancia recorrida	Rf	Log
Marcador de Peso Molecular	4072	2,4	0,24242424	3,60980777
	3054	2,9	0,29292929	3,48486903
	2036	3,7	0,37373737	3,30877777
	1636	4,2	0,42424242	3,21378330
	1018	5,2	0,52525253	3,00774778
	517	6,6	0,66666667	2,71349054
Gen <i>lip</i>	998	5,1	0,58585859	2,87847575

Remplazando el valor del Rf de la muestra en la ecuación (Figura N° 13) se obtuvo como logaritmo de la muestra, el valor de 2,87847575. El cual representa a un tamaño aproximado de 998,423 pb. El tamaño teórico del fragmento es 990 pb, por lo que el producto de amplificación del gen *lip* de *Marinobacter* sp. LB fue el esperado.

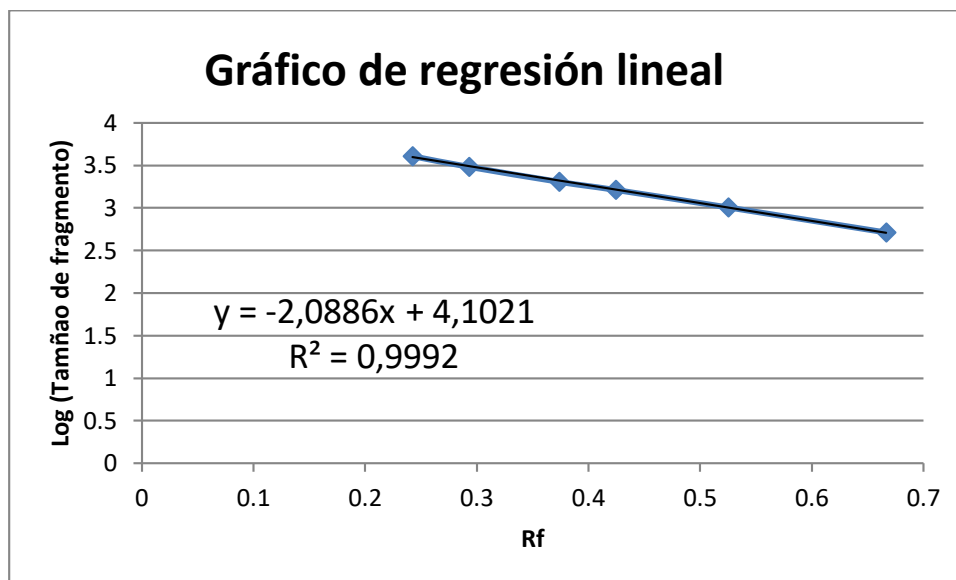


Figura N° 13. Gráfico de regresión lineal y ecuación, realizados a partir del marcador ADN 1 kb ladder (Invitrogen).

4.1.8. Análisis evolutivo del gen *lip* de *Marinobacter* sp. LB

Con ayuda del BlastN (Altschul *et al.*, 1990) se seleccionaron 14 muestras con altos porcentajes de similitud con la secuencia del gen *lip* de *Marinobacter* sp. LB, sin embargo los porcentajes de cobertura variaron dependiendo de las secuencias. También se incluyó a la secuencia del gen *lip* de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, debido a que ésta fue utilizada en los análisis de modelamiento estructural. Todas las secuencias y sus códigos de acceso están en la tabla N° 6.

Tabla N° 6. Código de acceso de secuencias nucleotídicas de genes *lip* de especies cercanas a *Marinobacter* sp. LB

Especie	Cepa	Código de acceso (gb)	Similitud (%)	Cobertura (%)
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	ATCC49840	FO203363.1	97	97
<i>M. adhaerens</i>	HP15	CP001978.1	93	93
<i>M. similis</i>	A3d10	CP007151.1	92	92
<i>Pseudomonas mendocina</i>	ymp	CP000680.1	69	91
<i>P. alcaliphila</i>	JAB1	CP016162.1	69	92
<i>P. mendocina</i>	NK-01	CP002620.1	68	92
<i>Aeromonas veronii</i>	CB51	CP015448.1	70	27
<i>A. media</i>	WS	CP007567.1	77	15
<i>Chromobacterium violaceum</i>	ATCC12472	AE016825.1	69	29
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1	X63390.1	73	12
<i>Myxococcus fulvus</i>	HW-1	CP002830.1	71	11
<i>Rhodoferrax ferrireducens</i>	T118	CP000267.1	70	18
<i>Klebsiella michiganensis</i>	RC10	CP011077	73	9

Las secuencias de genes *lip* fueron sometidas a un alineamiento múltiple. El corte de los extremos se realizó con ayuda del programa Bioedit (Hall, 1999) considerando los codones de inicio y término en cada muestra. Motivo por el cual, el número de nucleótidos fue diferente por cada gen *lip* (Anexo N° 5). Las secuencias no mostraron saturación, es decir las mutaciones acumuladas por evolución de los organismos no interfiere en el alineamiento, por lo que se continuo con los análisis evolutivos.

Los genes *lip*, de las especies seleccionadas, presentaron 58 sitios conservados y 791 sitios informativos, a partir de los cuales se generaron los arboles (NJ, ML y MP). En todos los análisis se observaron: la formación de dos clados indica que las lipasas de las especies del grupo azul (Figura N° 14) evolucionaron de manera diferente a las del grupo rojo; la lipasa de *Marinobacter* sp. LB, se encontró dentro de un clado junto con las lipasas de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ATCC49840 y *Marinobacter adhaerens*

HP15, robustecido con bootstraps de 100 por ciento; *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, forma parte del clado azul, demostrando una buena relación evolutiva con la lipasa de *Marinobacter* sp. LB y por ende haciendo de este un buen candidato para los futuros análisis de modelado estructural.

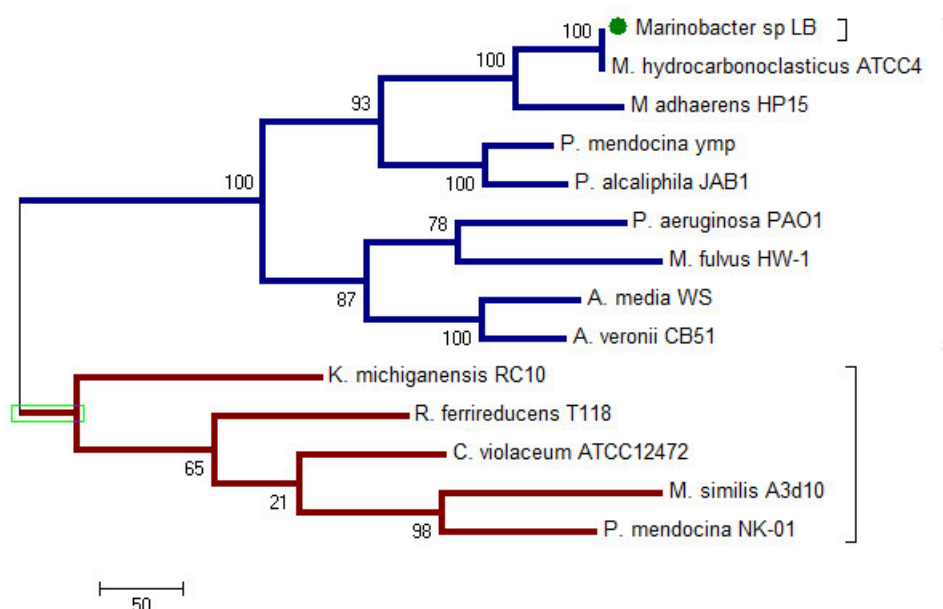


Figura N° 14. Árbol filogenético (ML) realizado con las secuencias del gen *lip* de especies con altos porcentajes de similitud con *Marinobacter* sp. LB (●). El valor del Bootstrap fue de 1000 replicaciones y la barra de 50 % indica la divergencia de las secuencias.

4.1.9. Análisis *in silico* de la estructura primaria de la lipasa de *Marinobacter* sp. LB

Para el análisis de la estructura primaria se realizó un alineamiento de 21 secuencias aminoacídicas de lipasas pertenecientes a la familia I (Verdaderas lipasas), incluida la secuencia peptídica proveniente del gen *lip* de *Marinobacter* sp. LB. En la tabla N° 7, se presenta los números de acceso de las secuencias aminoacídicas utilizados para este análisis.

Tabla N° 7. Códigos de acceso de secuencias aminoacídicas de lipasas de la familia I utilizadas para el análisis y clasificación de la lipasa de *Marinobacter* sp. LB

Especie	Cepa	Código de acceso (gb/emb/dbj)	Código de acceso (gi)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	C9	AAC15585.1	3098280
<i>P. fragi</i>	IFO-12049	CAA32193.1	45513
<i>P. aeruginosa</i> *	ATCC31156	BAA09135.1	1752730
<i>P. mendocina</i>	ymp	WP_003239806.1	146307587
<i>P. mendocina</i>	PK-12CS	AAM14701.1	20278646
<i>P. stutzeri</i>	-	WP_011913157	146282376
<i>P. wisconsinensis</i>	LMG P-15151	AAB53647.1	2072017
<i>P. luteola</i>	-	AAC05510.1	2952336
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	BD413	CAA56780.1	870829
<i>Proteus vulgaris</i>	K80	AAB01071.1	1322025
<i>Burkholderia glumae</i> *	CBS 322.89	CAA49812.1	49206
<i>B. cepacia</i> *	-	AAA50466.1	557867
<i>Vibrio cholerae</i>	12129(1)	EEN99655	-
<i>Rhodoferrax ferrireducens</i>	T118	WP_011465630.1	89902127
<i>Myxococcus xanthus</i>	-	WP_011555480.1	108756922
<i>Chromobacterium violaceum</i>	ATCC12472	NP_902384.1	34498169
<i>C. viscosum</i> *	ATCC6918	Q05489.1	585408
<i>Marinobacter adhaerens</i> **	HP15	CP001978.1	-
<i>M. manganoxydans</i> **	Mn17-9	-	358449818
<i>M. algicola</i> **	DG893	-	149376103
*, Secuencias representativas de lipasas de la familia I (verdaderas lipasas).			
**, Secuencias de aminoácidos obtenidas a partir del genoma completo.			

El alineamiento de secuencias aminoacídicas de las lipasas de la Familia I (Figura N° 15) demostró la presencia de gran cantidad de residuos conservados. La estructura primaria es parecida entre las especies representativas con las de *Marinobacter* (incluida la cepa en estudio).

El tamaño aproximado (incluyendo los espacios) de las secuencias peptídicas fue de 391 aminoácidos. Sin embargo, este número varía según especie. Las regiones donde se encuentran los aminoácidos de la triada catalítica (serina - ácido aspártico - histidina) son conservadas en todos los casos.

Pseudomonas_fragi	1	-----MD
Proteus_vulgaris	1	-----ME
Pseudomonas_fluorescens	1	-----MS
Pseudomonas_mendocina	1	---MKNKNTLLA CLG-----SALALSG--QAFAT-----GS
Pseudomonas_stutzeri	1	---MKNKNTLLA CLG-----SALALSG--QAFAT-----GS
Pseudomonas_mendocina_ym	1	---MKNKNTLLA CLG-----TGLLASGQTQAFNFG-----SS
Pseudomonas_aeruginosa*	1	---MKNKNTLLA CLG-----GLASLA--ASPLIQ-----AS
M.adhaerensADP96110	1	-----
M.manganooxydansMnI7-9	1	---MLWQIAMA ALT-----VWSAPSAAWWWDST-----PS
M.algicolaDG893	1	---MKNKNTLLA CLG-----VWSAPSMAWWWNST-----PS
Myxococcus_xanthus	1	---MDPSPEQEP LMRNAVRTL-----VAVALG-LWSQPAL-----AN
Acinetobacter_calcoaceticus	1	---MFKLLFTT LLVLTQP-----VFATSPIQNPTTSFV-----IS
Burkholderia_glumae*	1	MVRSMSRVAARA AWALAVMPLAG-----AAGLTMAAS-----PAAVA-----AD
Chromobacterium_viscosum*	1	MVRSMSRVAARA AWALAVMPLAG-----AAGLTMAAS-----PAAVA-----AD
Burkholderia_cepacia*	1	MARTMSRVAARA AWALAVMPLAG-----TTAVTLATTHAAMAATAP-----AA
Pseudomonas_luteola	1	---MSRVAARA AWALAVMPLAG-----SAALMAATTHVAMAATAP-----AD
Vibrio_cholerae	1	---MTLFSVNETHATSCDSKTEDKNEKEYPLNKIII IALSLSFSSSIWAGTSAHALSQ
Rhodoferrax_ferrireducens	1	---MTWLGG-----CLALALLPASSWA-----A
Chromobacterium_violaceum	1	---MQQLLS-----RTACLALALLPFAAAHAQ-----S
Pseudomonas_wisconsinensis	1	---MVRVYTAAT-----LAT--LALLGAVBAQ-----A
Marinobacter_sp	1	---MFAMPPIR-----LVAGILMLVFSVLSH-----A
Pseudomonas_fragi	3	DSVNTTRYPI VLHVG FGFDR-----GSHHY HGIKQALNECGASV VPII S ANDNEA-
Proteus_vulgaris	3	N-MSTTRYPIVLHVG SGFDI-----VGYPY YGIRDALER DGHKV TASIS FNSNEV-
Pseudomonas_fluorescens	3	QSTATRYPI VLHVG FGFDR-----L YFYWYGIKALRGGATVIAV VSPINS EV-
Pseudomonas_mendocina	29	GYTATTRYPIVLHVG FGFDSI-----LGY DYWYGI PSALRRDGAQVVT BVSQLNTSEL-
Pseudomonas_stutzeri	29	GYTATTRYPIVLHVG FGFDSI-----LGY DYWYGI PSALRRDGAQVVT BVSQLNTSEL-
Pseudomonas_mendocina_ym	31	GYTOTTRYPIVLHVG FGFDSI-----LGV DYWYGI PAALRRDGAQVVT BVSQLDTS EA-
Pseudomonas_aeruginosa*	28	TYTOTTRYPIVLHVG FGFDSI-----LGV DYWYGI PSALRRDGAQVVT BVSQLDTS EV-
M.adhaerensADP96110	1	-----VLHVG FGFDSI-----AGV DYWYGI AEDLRNGADVVT VPLDLS IA-
M.manganooxydansMnI7-9	31	NYTDTRYPI VLHVG FGFDSI-----AGV DYWYGI AEDLRNGADVVT VPLDLS IA-
M.algicolaDG893	31	NYTDTRYPI VLHVG FGFDSI-----VGV DYWYGI AEDLRNGADVVT VPLDLS IA-
Myxococcus_xanthus	37	TOTTRYPIVLHVG FGFDSI-----FGVDY YGI GSDLSGGATVIVTS VPOFNTIEQ-
Acinetobacter_calcoaceticus	35	DYAKTRYPIVLHVG FGFNK LGTEAFGL DYWYGI PQDIA NGANV VTRQSTANTSEF-
Burkholderia_glumae*	42	TYAATRYPI VLHVG AGTKF---ANVVDYWYGI QSDLSHGAKVIVANLS FCSDEGP
Chromobacterium_viscosum*	42	TYAATRYPI VLHVG AGTKF---ANVVDYWYGI QSDLSHGAKVIVANLS FCSDEGP
Burkholderia_cepacia*	47	GYAATRYPI VLHVG AGTKY---AGVL YWYGI QEDLQNGATVIVANLS FCSDEGP
Pseudomonas_luteola	43	NYAATRYPI VLHVG AGTKY---AGVL YWYGI QEDLQNGATVIVANLS FCSDEGP
Vibrio_cholerae	57	GYTOTTRYPIVLHVG FGFDSI-----AGMDY HGI PQSLT DGAQVIVAVS VTSER-
Rhodoferrax_ferrireducens	22	GYTOTTRYPIVLHVG FGFDSI-----GPI DYWYGI PSALRRDGAQVVT BVSQLNTSEL-
Chromobacterium_violaceum	27	GYTOTTRYPIVLHVG FGFDSI-----LGV DYWYGI PAALRRDGAQVVT BVSQLNTSEL-
Pseudomonas_wisconsinensis	23	NYTKTRYPIVLHVG FGFDSI-----GLVNY HTIPWNLE DGAQVIVAVS VTSER-
Marinobacter_sp	25	SYTOTTRYPIVLHVG FGFDSI-----GLVNY HTIPWNLE DGAQVIVAVS VTSER-

Pseudomonas_fragi	57	--RGEQLLKQHNRROVGLQSVNLIGHSGGPTIRYVAALASVTSVSGPHKGS
Proteus_vulgaris	56	--RGEQLWEFVQVKEKTKKKNLIGHSGGPTIRYVAALASVTSVSGPHKGS
Pseudomonas_fluorescens	57	--RGEQLLARDEHREKGNLIGHSGGPTIRYVAALASVTSVSGPHKGS
Pseudomonas_mendocina	83	--RGEQLLAQVEEIVALSCKPKVNLIGHSHGGPTIRYVAALASVTSVSGPHKGS
Pseudomonas_stutzeri	83	--RGEQLLAQVEEIVALSCKPKVNLIGHSHGGPTIRYVAALASVTSVSGPHKGS
Pseudomonas_mendocina_ym	85	--RGEQLLAQVEEIVALSCKPKVNLIGHSHGGPTIRYVAALASVTSVSGPHKGS
Pseudomonas_aeruginosa*	82	--RGEQLLAQVEEIVALSCKPKVNLIGHSHGGPTIRYVAALASVTSVSGPHKGS
M.adhaerensADP96110	46	--RGEALLPOVQATAMHG--KVNIGHSHGGPTIRYVAALASVTSVSGPHKGS
M.manganooxydansMnI7-9	85	--RGEALLPOVQATAMHG--KVNIGHSHGGPTIRYVAALASVTSVSGPHKGS
M.algicolaDG893	85	--RGEALLPOVQATAMHG--KVNIGHSHGGPTIRYVAALASVTSVSGPHKGS
Myxococcus_xanthus	92	--RGEALLAQVKDILARSCKKKNLIGHSHGGPTIRYVAALASVTSVSGPHKGS
Acinetobacter_calcoaceticus	93	--RGEQLLAQVKDILARSCKKKNLIGHSHGGPTIRYVAALASVTSVSGPHKGS
Burkholderia_glumae*	98	NGRGEQLLAYVKQVLAAGTKVNLIGHSGGPTIRYVAALASVTSVSGPHKGS
Chromobacterium_viscosum*	98	NGRGEQLLAYVKQVLAAGTKVNLIGHSGGPTIRYVAALASVTSVSGPHKGS
Burkholderia_cepacia*	103	NGRGEQLLAYVKQVLAAGTKVNLIGHSGGPTIRYVAALASVTSVSGPHKGS
Pseudomonas_luteola	99	KGRDEQLLAYVKQVLAAGTKVNLIGHSGGPTIRYVAALASVTSVSGPHKGS
Vibrio_cholerae	111	--RGEQLLAQVESLAAGTKKKNLIGHSHGGPTIRYVAALASVTSVSGPHKGS
Rhodoferrax_ferrireducens	76	--RGEQLLAQVKQVLAAGTKKKNLIGHSHGGPTIRYVAALASVTSVSGPHKGS
Chromobacterium_violaceum	81	--RGEQLLAQVKQVLAAGTKKKNLIGHSGGPTIRYVAALASVTSVSGPHKGS
Pseudomonas_wisconsinensis	78	--RGAFLARQVFW--AGGCKKNLIGHSGGPTIRYVAALASVTSVSGPHKGS
Marinobacter_sp	80	--RGEQLANYVN---SLGCKKNLIGHSGGPTIRYVAALASVTSVSGPHKGS

Pseudomonas_fragi	115	IADRI	RLAFV	PGR--	LG	ET	VAAA	TTS	FSAF	SAL	SG--	HPRLP	--	QNAL	NT	NAL	TTD
Proteus_vulgaris	114	IADL	VRR	MRKDS--	VP	EY	ADAM	MKA	GT	I	STFSG--	NRGNP--	Q	AI	AA	EAL	TT
Pseudomonas_fluorescens	115	IADY	QQHY	PANT--	AKGR	LEA	LRL	GW	L	AR	ETGY	HGPKLP--	V	I	H	SHO	SL
Pseudomonas_mendocina	141	VADL	IRK	PEGSSG---	EA	IAG	VNA	CAF	INF	SGSS	STAP---	QNSL	CS	TS	BS	IN	E
Pseudomonas_stutzeri	141	VADL	IRK	PEGSSG---	EA	IAG	VNA	CAF	INF	SGSS	STAP---	QNSL	CS	TS	BS	IN	E
Pseudomonas_mendocina_ym	143	TADF	IKG	SEGPAG	VATP	LVG	VN	LCAL	INF	SGSS	STTP---	QNAL	CS	TS	BS	IN	E
Pseudomonas_aeruginosa*	140	TADF	IRQ	PPGSAG---	EA	LSG	VNS	LCAL	TSFLS	SGSTGT	---	QNSL	CS	TS	BS	IN	E
M.adhaerensADP96110	102	VADL	IY	CSF-----	AB	SAAS	GNAL	GG	ID	LSG	GGYN-----	QDLR	SS	TS	BS	LT	Q
M.manganoxydansMnI7-9	141	VADL	IY	CSF-----	AB	SAAS	GNAL	GG	ID	LSG	GGYN-----	QDLR	SS	TS	BS	LT	Q
M.algicolaDG893	141	VADL	IY	CSF-----	AB	SAAS	GNAL	GG	ID	LSG	GGYN-----	QDLQ	SS	TS	BS	LT	E
Myxococcus_xanthus	150	IADY	IR	NLRGGS--	FT	ESV	LAY	FAN	LGTV	GL	LSGKTNP-----	QDAI	GATA	AA	LS	KS	
Acinetobacter_calcoaceticus	151	IADL	IY	KTLAG-----	TP	EAP	ATI	FNV	ANF	I	GQFDDP	PQKY	P	MNS	VGA	AY	SL
Burkholderia_glumae*	158	FADF	QD	LKTD-----	TC	SST	V	IAA	FVN	FGT	V	SSSHNTD---	QDAL	AA	RL	LT	TA
Chromobacterium_viscosum*	158	FADF	QD	LKTD-----	TC	SST	V	IAA	FVN	FGT	V	SSSHNTD---	QDAL	AA	RL	LT	TA
Burkholderia_cepacia*	163	FADF	QD	LAYDP-----	TC	SSS	V	IAA	FVN	FGI	L	SSSHNTN---	QDAL	AA	RL	LT	TA
Pseudomonas_luteola	159	FADF	QD	LAYDP-----	TC	SSS	V	IAA	FVN	FGI	L	SSSHNTN---	QDAL	AA	RL	LT	TA
Vibrio_cholerae	169	VADL	VRG	IPSDS--	VS	Q	AVG	T	Q	VAL	ID	LSG	GKAHP---	QPLA	SL	AA	LT
Rhodferax_ferrireducens	134	VADL	VRG	IPPGS--	LSNS	V	LIS	TN	LG	TS	LSG	SGSGLS---	QSLA	AA	SL	LT	TA
Chromobacterium_violaceum	139	VADL	VRG	IPPGS--	VSE	N	AAA	VGA	FVK	TA	AFSG	TDLP---	QOP	LA	AA	SL	LT
Pseudomonas_wisconsinensis	135	VADL	VRG	IPPGSG--	IE	GGANA	ANAL	GAM	IN	LSG	SSNP-----	QNG	N	AL	SL	LT	TA
Marinobacter_sp	134	VADL	VRG	IPPGSY--	VE	GGADA	ANAL	GAM	IN	LSG	ASNP-----	QDGI	AA	AA	SL	LT	TP

Pseudomonas_fragi	168	GVAA	FN	RQYF--	QG	LE	DR	WG	CM	GPAQ--	LV	NVH---	YYS	WS	GI	IKG	-----	
Proteus_vulgaris	167	NVMB	EN	KKMF--	QG	LE	BAI	RG	EG	KEV--	LV	NVH---	YYS	WS	GI	IKG	-----	
Pseudomonas_fluorescens	171	GVAA	FN	RQYF--	QG	LE	BAI	RG	EG	KEV--	LV	NVH---	YYS	WS	GI	IKG	-----	
Pseudomonas_mendocina	194	GAAR	ENAK	EF--	QG	LE	BAI	RG	EG	KEV--	LV	NVH---	YYS	WS	GI	IKG	-----	
Pseudomonas_stutzeri	194	GAAR	ENAK	EF--	QG	LE	BAI	RG	EG	KEV--	LV	NVH---	YYS	WS	GI	IKG	-----	
Pseudomonas_mendocina_ym	199	GAAR	ENAK	EF--	QG	LE	BAI	RG	EG	KEV--	LV	NVH---	YYS	WS	GI	IKG	-----	
Pseudomonas_aeruginosa*	192	GAAR	ENAK	EF--	QG	LE	BAI	RG	EG	KEV--	LV	NVH---	YYS	WS	GI	IKG	-----	
M.adhaerensADP96110	149	GSAB	ENNF	AF--	QG	LE	BAI	RG	EG	KEV--	LV	NVH---	YYS	WS	GI	IKG	-----	
M.manganoxydansMnI7-9	188	GSAB	ENNF	AF--	QG	LE	BAI	RG	EG	KEV--	LV	NVH---	YYS	WS	GI	IKG	-----	
M.algicolaDG893	188	GSAB	ENNF	AF--	QG	LE	BAI	RG	EG	KEV--	LV	NVH---	YYS	WS	GI	IKG	-----	
Myxococcus_xanthus	202	GVAA	FN	RQYF--	QG	LE	DR	WG	CM	GPAQ--	LV	NVH---	YYS	WS	GI	IKG	-----	
Acinetobacter_calcoaceticus	205	GAAR	ENAK	EF--	QG	LE	BAI	RG	EG	KEV--	LV	NVH---	YYS	WS	GI	IKG	-----	
Burkholderia_glumae*	210	QIAT	INRN	FS--	SG	GAP	GS	Q	TGA	AT	ETV	GGS	QHLL	YS	WG	TAI	QPT	
Chromobacterium_viscosum*	210	QIAT	INRN	FS--	SG	GAP	GS	Q	TGA	AT	ETV	GGS	QHLL	YS	WG	TAI	QPT	
Burkholderia_cepacia*	215	RAAT	INQN	FS--	SG	GAP	GS	Q	TGA	AT	ETV	GGS	QHLL	YS	WG	TAI	QPT	
Pseudomonas_luteola	211	QAAT	INQN	FS--	SG	GAP	GS	Q	TGA	AT	ETV	GGS	QHLL	YS	WG	TAI	QPT	
Vibrio_cholerae	222	GSLE	FNQY	IF--	EG	LE	BAI	RG	EG	KEV--	LV	NVH---	YYS	WS	GI	IKG	-----	
Rhodferax_ferrireducens	187	GSLE	FNQY	IF--	EG	LE	BAI	RG	EG	KEV--	LV	NVH---	YYS	WS	GI	IKG	-----	
Chromobacterium_violaceum	192	GSLE	FNQY	IF--	EG	LE	BAI	RG	EG	KEV--	LV	NVH---	YYS	WS	GI	IKG	-----	
Pseudomonas_wisconsinensis	187	GSAL	NSR	HEW	VNT	SS	YCA	K	ST	EV	HN	RG	HS	IR	YYS	WS	GI	
Marinobacter_sp	186	GS	TS	IND	AL	G	W	K	G	NR	N	AC	A	T	SE	D	V	W

Pseudomonas_fragi	207	-SRLA	ESIN	LDPE	LHNA	RV	FDS	FE	TRE	-TREND	GM	VGR	FSS	HL	QV	IR	SD
Proteus_vulgaris	206	-LIAGE	KGN	LDPE	LHAA	RVL	SA	FT	---	ERE	NDGL	VGR	TS	MR	KG	I	DD
Pseudomonas_fluorescens	210	-GK	DRGN	FD	G	NRS	CL	FAK	TVRE	-PGQC	DM	VGR	YSS	HL	GT	V	CD
Pseudomonas_mendocina	229	---	TSPT	TNPL	LDV	SLAM	GAG	SLAF	---	SG	END	GLV	GR	CS	SH	GM	VIR
Pseudomonas_stutzeri	229	---	TSPT	TNPL	LDV	SLAM	GAG	SLAF	---	SG	END	GLV	GR	CS	SH	GM	VIR
Pseudomonas_mendocina_ym	234	---	TSPT	TNPL	LDV	SLAM	GAG	SLAF	---	SG	END	GLV	GR	CS	SH	GM	VIR
Pseudomonas_aeruginosa*	227	---	TSPT	TNPL	LDV	SLAM	GAG	SLAF	---	SG	END	GLV	GR	CS	SH	GM	VIR
M.adhaerensADP96110	184	---	TSPT	TNPL	LDV	SLAM	GAG	SLAF	---	SG	END	GLV	GR	CS	SH	GM	VIR
M.manganoxydansMnI7-9	223	---	TSPT	TNPL	LDV	SLAM	GAG	SLAF	---	SG	END	GLV	GR	CS	SH	GM	VIR
M.algicolaDG893	223	---	TSPT	TNPL	LDV	SLAM	GAG	SLAF	---	SG	END	GLV	GR	CS	SH	GM	VIR
Myxococcus_xanthus	238	---	TSPT	TNPL	LDV	SLAM	GAG	SLAF	---	SG	END	GLV	GR	CS	SH	GM	VIR
Acinetobacter_calcoaceticus	240	---	TSPT	TNPL	LDV	SLAM	GAG	SLAF	---	SG	END	GLV	GR	CS	SH	GM	VIR
Burkholderia_glumae*	270	TG	-TLD	ANVT	DP	SLA	LAT	GAV	MIN	RAS	GQ	NDGL	V	RC	SS	LF	QV
Chromobacterium_viscosum*	270	TG	-TLD	ANVT	DP	SLA	LAT	GAV	MIN	RAS	GQ	NDGL	V	RC	SS	LF	QV
Burkholderia_cepacia*	275	TLPL	VD	PAN	VLD	PS	LAL	FG	CTV	MIN	RAS	GQ	NDGL	V	RC	SS	LF
Pseudomonas_luteola	271	TIPL	ID	PAN	VLD	PS	LAL	FG	CTV	MIN	RAS	GQ	NDGL	V	RC	SS	LF
Vibrio_cholerae	257	---	AAT	YTN	LD	PS	VA	GL	T	GL	VEN	---	BE	NDGL	V	RC	SS
Rhodferax_ferrireducens	222	---	AKPY	TNV	FD	VL	PA	AL	T	SLA	ENG	---	AK	NDGL	V	RC	SS
Chromobacterium_violaceum	227	---	AATT	TN	LD	PL	TP	GA	L	SLA	ENG	---	TP	SG	LV	RC	SS
Pseudomonas_wisconsinensis	227	---	NAAY	TNV	LD	AA	PP	FT	T	GL	V	ENG	---	SE	NDGL	V	RC
Marinobacter_sp	226	---	RAVW	TNV	FD	VL	PA	AL	T	SLA	ENG	---	SE	NDGL	V	RC	SS

Pseudomonas_fragi	265	NHARGSAG-----ASTR--
Proteus_vulgaris	262	NCVA-GLVGPGEDIVATVTHANFLASKKI-
Pseudomonas_fluorescens	268	NCST-GLVGKADPVRLEVEHAARLKAAGL-
Pseudomonas_mendocina	282	NCFMGLTSLFETDPVIVRQHANRLKNAGL-
Pseudomonas_stutzeri	282	NCFMGLTSLFETDPVIVRQHANRLKNAGL-
Pseudomonas_mendocina_ymp	288	NCTLGLTSLFETDPVIVRQHANRLKNAGL-
Pseudomonas_aeruginosa*	282	NCVFGLTSLFETSPVIVRQHANRLKNAGL-
M.adhaerensADP96110	238	NCALGLHSLFETDPKAVFVQHANRLKNAGL-
M.manganoxydansMnI7-9	277	NCALGLHSLFETDPKAVFVQHANRLKNAGL-
M.algicolaDG893	277	NCALGLHSLFETDPKAVFVQHANRLKNAGL-
Myxococcus_xanthus	291	NQVLGLTAFETN-EKIVERNHANRLKGLGL-
Acinetobacter_calcoaceticus	293	NQVLGFDLFLHKTFFPSLDMPIVSIVKIYN
Burkholderia_glumae*	329	NQVLGVFGANABDPVAVITHTVNRKLQGL-
Chromobacterium_viscosum*	329	NQVLGVFGANABDPVAVITHTVNRKLQGL-
Burkholderia_cepacia*	335	NQVLGVFGANABDPVAVITHTVNRKLQGL-
Pseudomonas_luteola	331	NQVLGVFGANABDPVAVITHTVNRKLQGL-
Vibrio_cholerae	310	NCGLGLHSLFETDPVIVRQHANRLKNAGL-
Rhodospirillum_ferrireducens	276	NCTGLVNLFFETNPVFLRQGANRLKNLGL-
Chromobacterium_violaceum	281	NQSFGLVSLFFVSPVSLRQGANRLKNAGL-
Pseudomonas_wisconsinensis	281	NHIFSGRG--WTFPVSLRQHANRLKNAGL-
Marinobacter_sp	280	NHILGASL-WNTPVSLRQGANRLKNAGL-

Figura N° 15. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de lipasas de la Familia I, incluido *Marinobacter* sp. LB aislado de las Salinas de Pilluana. Las letras con cuadros negros representan aminoácidos conservados en distintas especies; mientras que los cuadros plomos, aminoácidos con propiedades similares. Los ****, indican las secuencias conservadas que incluyen a los aminoácidos catalíticos.

Por ejemplo: entre las posiciones aminoacídicas 142 y 156 está el pentapéptido conservado Gly-X-Ser-X-Gly, el cual incluye al primer aminoácido catalítico. La otra región se encuentra entre las posiciones 333 y 341 con los aminoácidos Asn-Asp-Gly-Leu-Val, el cual presenta al segundo aminoácido catalítico. Por último, la región entre las posiciones 355 y 361 contiene a la secuencia Asn(Asp)-His-Leu-Asp, que contiene al tercer aminoácido catalítico.

El tamaño de la secuencia nucleotídica del gen *lip* de *Marinobacter* sp. LB desde el codón de inicio hasta el de término, es de 927 nucleótidos. Por lo tanto, el tamaño de la secuencia polipeptídica inmadura de esta lipasa es de 308 aminoácidos (Figura N° 16). El análisis del contenido aminoacídico indica que los aminoácidos en mayor proporción son glicina (11 %), alanina (9,4 %) y leucina (9,1 %). Por el contrario están ácido glutámico (1,9 %), triptófano (1,9 %) y cisteína (0,6 %) (Tabla N° 8).

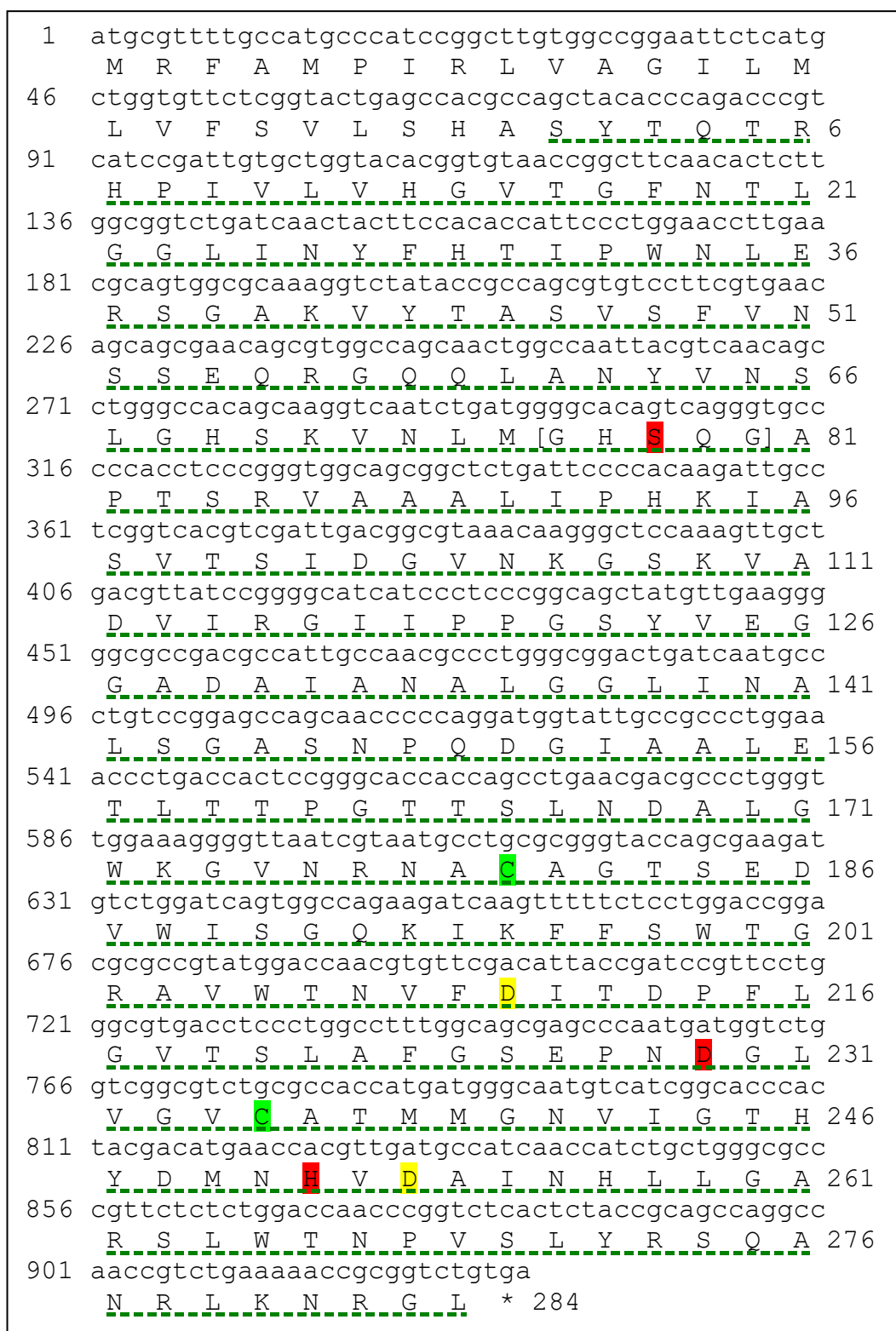


Figura N° 16. Secuencia aminoacídica de lipasa de *Marinobacter* sp. LB. ---, secuencia de la lipasa madura con 284 aminoácidos; [GXSG], pentapéptido conservado de la familia I; SDH, triada catalítica; C, residuos de cisteínas formadores del puente disulfuro; D, residuos de ácido aspártico que forman enlaces con Ca²⁺.

Tabla N° 8. Composición de aminoácidos presentes en la cadena inmadura de la Lipasa de *Marinobacter* sp. LB

Aminoácido	Código	Unidades	Porcentaje (%)
Alanina	Ala (A)	29	9.4
Arginina	Arg (R)	13	4.2
Asparagina	Asn (N)	22	7.1
Ácido aspártico	Asp (D)	11	3.6
Cisteína	Cys (C)	2	0.6
Glutamina	Gln (Q)	8	2.6
Ácido glutámico	Glu (E)	6	1.9
Glicina	Gly (G)	34	11.0
Histidina	His (H)	10	3.2
Isoleucina	Ile (I)	19	6.2
Leucina	Leu (L)	28	9.1
Lisina	Lys (K)	9	2.9
Metionina	Met (M)	7	2.3
Fenilalanina	Phe (F)	10	3.2
Prolina	Pro (P)	12	3.9
Serina	Ser (S)	27	8.8
Treonina	Thr (T)	21	6.8
Triptófano	Trp (W)	6	1.9
Tirosina	Tyr (Y)	7	2.3
Valina	Val (V)	27	8.8

El programa SignalP (Petersen *et al.*, 2011) (Figura N° 17), evaluó tres análisis para determinar el tamaño del punto de escisión, siendo el promedio de los tres resultados el aminoácido 24. Por lo que, el péptido señal de la lipasa de *Marinobacter* sp. LB, se encuentra en la región N-terminal de la proteína y consta de 24 aminoácidos iniciales. En consecuencia, la proteína madura extracelular tendría un tamaño teórico de 284 aminoácidos. La posición de los aminoácidos catalíticos son Serina 78,

Ácido aspártico 229 e Histidina 251. Cabe resaltar que las lipasas son enzimas dependientes de Ca^{2+} , por lo que los residuos de unión son los Ácidos aspárticos 210 y 253. En la figura N° 16 se detalla los codones y las posiciones de los aminoácidos mencionados.

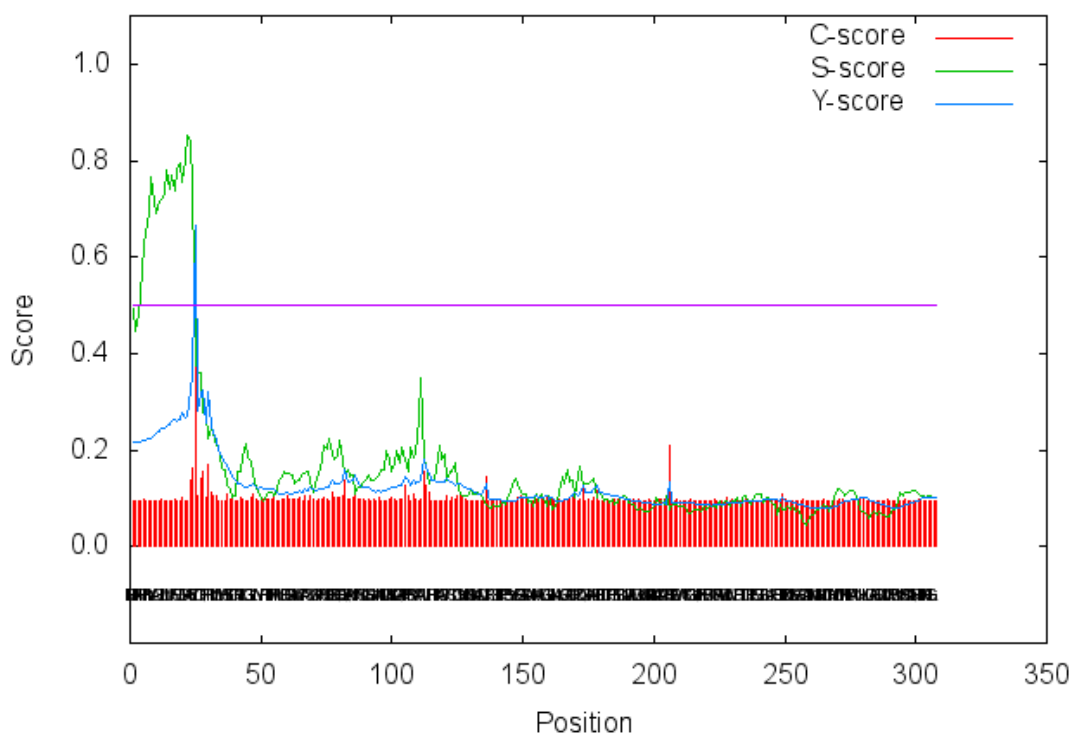


Figura N° 17. Identificación del péptido señal en la secuencia de Lipasa de *Marinobacter* sp. LB. Los score de Y, C y S fueron 22, 25 y 25 respectivamente, siendo la media aritmética de los análisis la posición 24 como longitud del péptido señal.

4.1.10. Análisis *in silico* de la estructura secundaria y terciaria de la lipasa de *Marinobacter* sp. LB

Al realizar el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la lipasa de *Marinobacter* sp. LB con las bases de datos, se encontraron seis proteínas similares de diferentes especies (Tabla N° 9).

Tabla N° 9. Comparación de aminoácidos de lipasas de *Marinobacter* sp. LB con cepas de referencia

Microorganismos	Producto	Código de acceso	Similitud (%)	Base de datos
<i>Vibrio cholerae</i>	Triacilglicerol lipasa	P15493.2	51	UniProtKB
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1*	Lipasa	1EX9	43	PDB
<i>Proteus mirabilis</i>	Lipasa	4HS9	37	PDB
<i>Pseudomonas</i> sp. 109	Lactonizing lipasa	P26877	43	UniProtKB
<i>P.</i> sp. KWI-56	Triacilglicerol lipasa	P25275	35	UniProtKB
<i>P. glumae</i> *	Lipasa	1TAH	34	PDB
*, presenta estructura cristalográfica				

La secuencia con mayor porcentaje de similitud es la lipasa de *Vibrio cholerae*, seguido por *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 con 51 y 43 %, respectivamente. De todas las proteínas encontradas solamente las pertenecientes a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y *Pseudomonas glumae*, fueron analizadas por cristalografía. Por tal motivo, la secuencia escogida como molde, para los siguientes análisis, fue la lipasa codificada como 1EX9 (secuencia plantilla). Cabe resaltar que las secuencias que se encuentran en las bases de datos *Protein Data Bank* y *UniProtKB*, son resultados de análisis de proteínas, por lo que todas presentan estructuras terciarias o cuaternarias, y no necesariamente son las secuencias encontradas en el NCBI.

Las secuencias aminoacídicas similares entre las lipasas de *Marinobacter* sp. LB y *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, indican la presencia de estructuras secundarias similares, así, las secuencias de aminoácidos son más conservadas que las de nucleótidos, debido a que el código genético es degenerado.

Con ayuda del programa Swiss-PDB Viewer (Guex & Peitsch, 1997) se pronosticó *in silico* la estructura de la lipasa de *Marinobacter* sp. LB, utilizando como plantilla la secuencia antes mencionada. En primera instancia se realizó el alineamiento entre las secuencias (Figura N° 18), en este análisis se utilizó la secuencia madura de la lipasa, en donde el péptido señal se eliminó, por tal motivo en el alineamiento no se evidencia a la metionina como primer aminoácido.

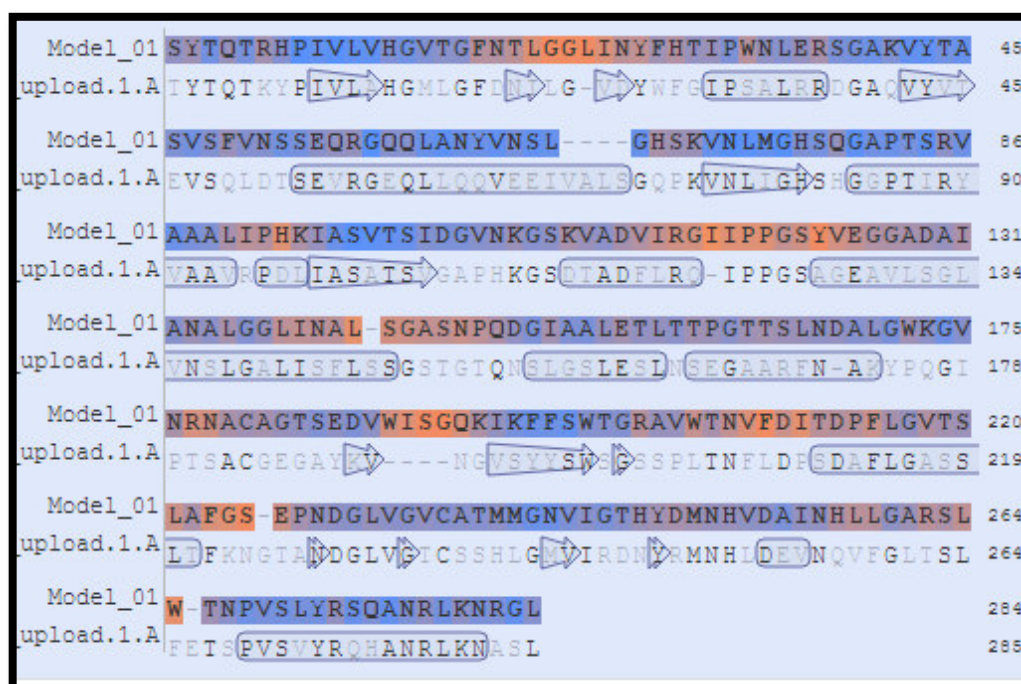


Figura N° 18. Alineamiento de aminoácidos entre lipasas de *Marinobacter* sp. LB (Model_01) y de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (upload.1.A). Realizado con el programa Swiss-PDB Viewer (Guex & Peitsch, 1997).

Debido a que la lipasa 1EX9 de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 fue caracterizada a nivel cristalográfico, sus estructuras secundarias son reconocidas por el programa (Figura N° 18) en donde se aprecia a las Láminas- β (en forma de flechas) y las α -Hélices (en recuadros). Por tal motivo, en las regiones donde los aminoácidos de ambas secuencias coincidían, se construyó la estructura terciaria de la lipasa de *Marinobacter* sp. LB. La raíz de la desviación cuadrática media (RMSD) obtenida con el

mismo programa, en donde se ajustaron los carbonos alfa de la estructura en mención, fue 0.32 Å.

En la figura N° 19 se observa la estructura modelada de la lipasa en estudio, con el programa Swiss-PDB Viewer (Guex & Peitsch, 1997), en donde las regiones rojas representan las α -Hélices y en amarillo las Láminas- β agrupadas en una sola región de la biomolécula.

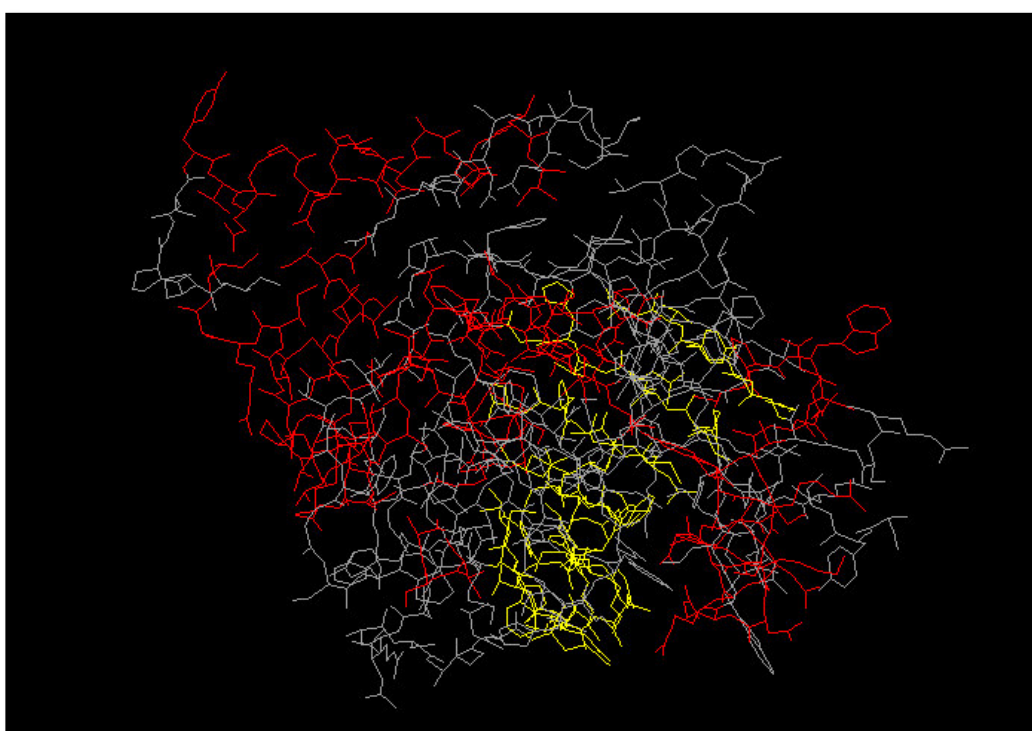


Figura N° 19. Disposición de las estructuras secundarias en el modelado de la Lipasa de *Marinobacter* sp. LB con el programa Swiss-PDB Viewer (Guex & Peitsch, 1997).

Para poder observar los detalles de la estructura terciaria de la lipasa de *Marinobacter* sp. LB, modelada con el programa Swiss-PDB Viewer (Guex & Peitsch, 1997), se abrió el archivo de salida con Discovery Studio 2017 R2 (Dassault Systèmes BIOVIA, San Diego, CA, USA). En donde se diferencia 11 α -hélices distribuidas en toda la proteína, mientras que 7 de las 9 láminas- β se agrupan en la región central de la biomolécula (Figura N° 20). La lipasa madura contiene 284 aminoácidos y presenta una similitud de

45,85 % con la lipasa 1EX9. En la figura N° 20 se observa que nuestra enzima es monomérica, siendo su peso molecular teórico de 29,99 kilo dalton (kDa) y su punto isoelectrico 8,89 (pH en donde la carga neta de la enzima es cero, por lo que en éste punto su solubilidad es casi nula).

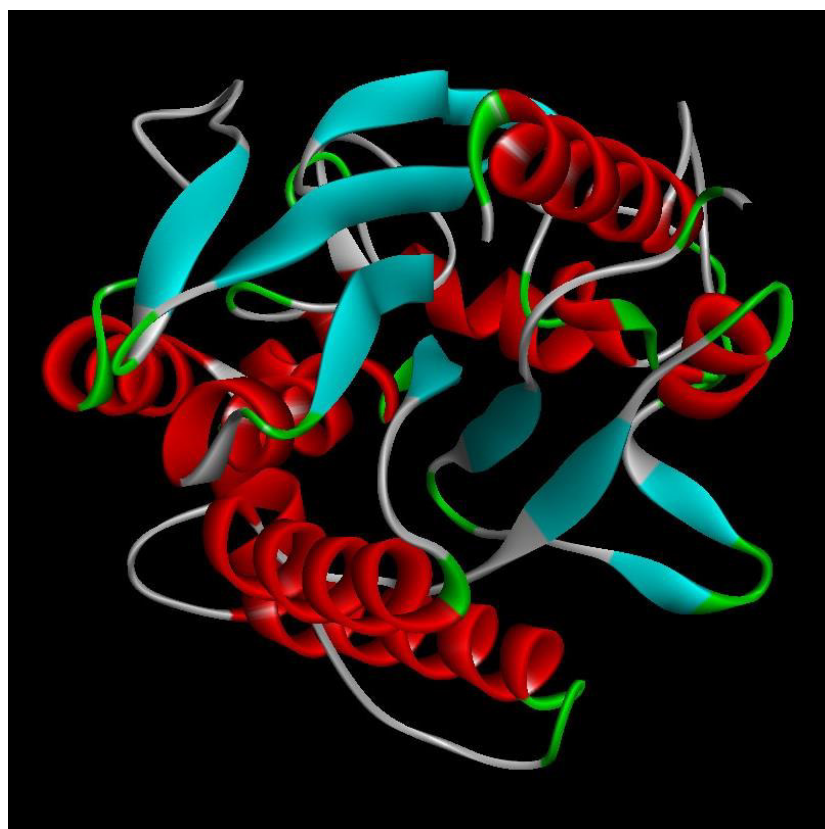


Figura N° 20. Lipasa de *Marinobacter* sp. LB modelada con el programa Swiss-PDB Viewer (Guex & Peitsch, 1997) y presentada con Discovery Studio 2017 R2 (Dassault Systèmes BIOVIA, San Diego, CA, USA). Láminas- β , regiones color turquesa; α -Hélices, espirales rojas.

4.1.10.1 Validación del modelamiento

Para validar la estructura diseñada se realizaron las evaluaciones de la calidad estereoquímica y del entorno de los aminoácidos. En la primera evaluación el programa RAMPAGE generó los diagramas de Ramachandran (Figura N° 21), el cual indica la conformación de los ami

noácidos en función a sus ángulos phi (Φ) y psi (Ψ) que pueden presentarse entre los enlaces del grupo amino ó carboxilo con el carbono alfa, la figuras N° 21.1 presenta tres parcelas marcadas, pertenecientes a las Lamina- β y α -Hélice con giro a la derecha e izquierda. La figura N° 21.2 indica la posición de los aminoácidos, en donde 261 (92,6 %) se encuentran en la región “favorecida” (zonas oscuras), 17 (6 %) en la región “permitida” (zonas claras) y 4 (1,4 %) en la “región desfavorable” (zonas blancas).

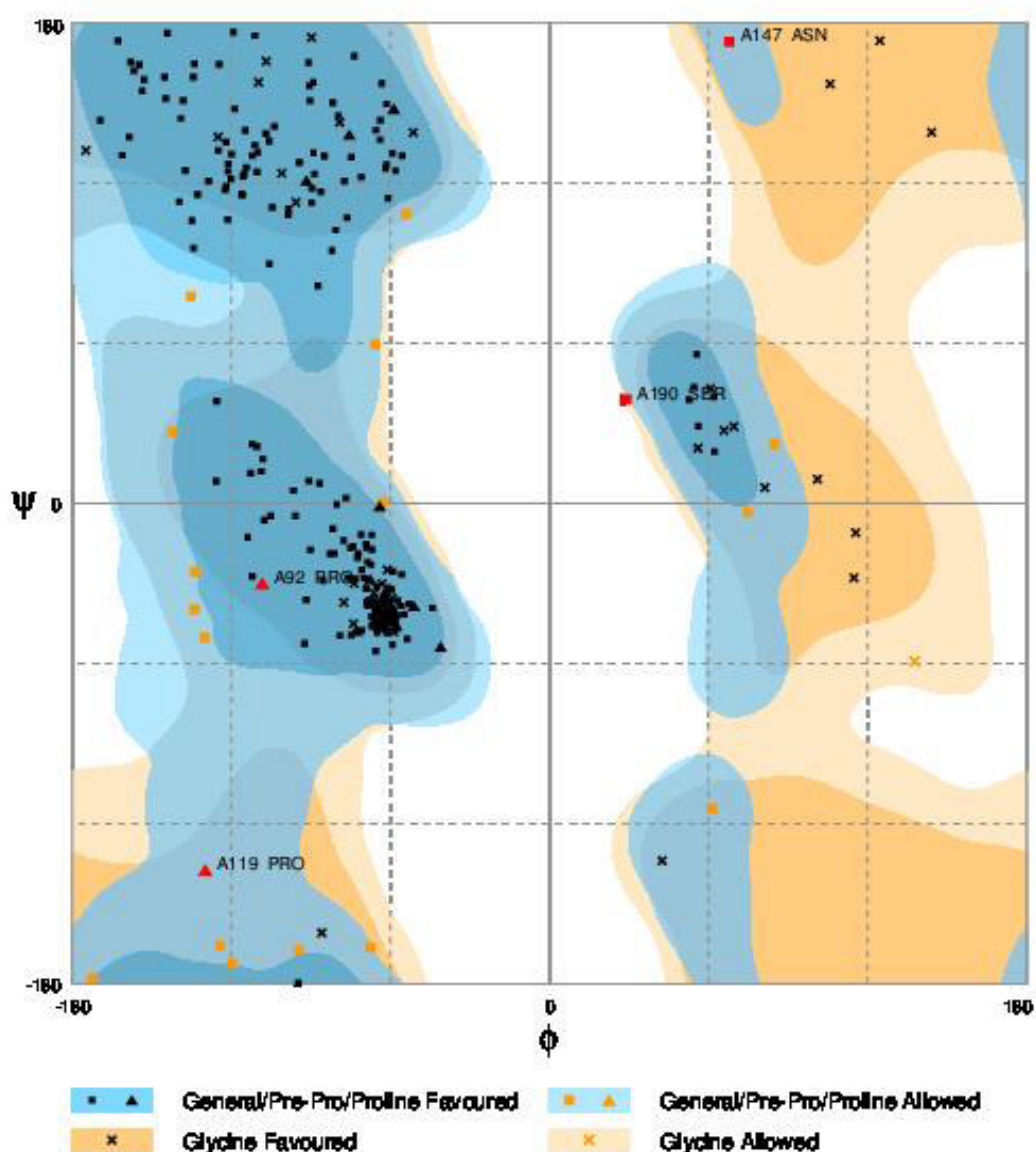


Figura N° 21.1. Diagrama General Ramachandran de la lipasa modelada de *Marinobacter* sp. LB, donde se visualiza las regiones energéticamente permitidas para los ángulos Phi (Φ) y Psi (Ψ). La región media derecha, superior y media izquierda, pertenecen a las α -hélices con giro a la izquierda, láminas- β y α -hélices con giro a la derecha, respectivamente.

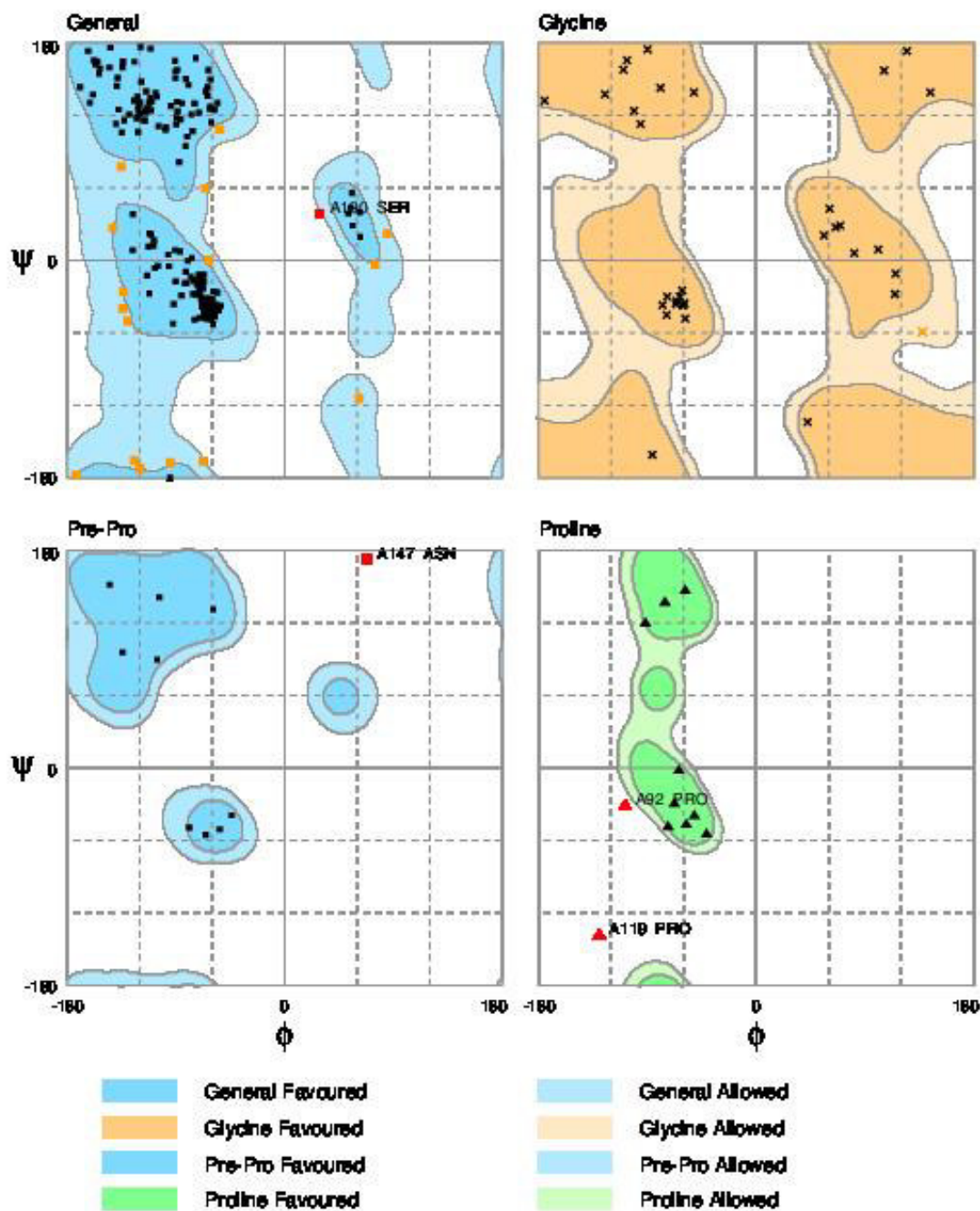


Figura N° 21.2. Diagrama Ramachandran desglosado. Muestra las regiones favorecidas (zonas oscuras), permitidas (zonas claras) y rechazadas (zona blanca), en donde se encuentran 261 (cuadrados, aspás, puntos y triángulos negros), 17 (cuadrados y aspás naranjas) y 4 aminoácidos (cuadrados y triángulos rojos), respectivamente. El diagrama muestra las parcelas de los posibles ángulos Φ y Ψ de los aminoácidos en general, glicina, pre-prolina y prolina.

En la segunda evaluación, el programa ERRAT (Colovos & Yeates, 1993), identificó la presencia de regiones incorrectamente plegadas en el modelado. En la figura N° 22 se observa que aproximadamente 12 aminoácidos (representados en barras) pertenecen a regiones rechazadas por exceder el límite permitido por el “valor de error”. Sin embargo, 272 aminoácidos forman parte de regiones plegadas que se encuentran dentro del límite permitido, por lo que el programa brindó un “Factor de calidad general” del 95,604%. Por otra parte, se analizó la estructura proteica, utilizando perfiles tridimensionales con el programa Verify 3D (Bowie *et al.*, 1991; Lüthy *et al.*, 1992), el cual analiza la compatibilidad de la estructura terciaria (3D) con su estructura primaria (1D), las puntuaciones pueden variar desde -1 (puntaje malo) hasta +1 (buen puntaje). En la figura N° 23 se observa que los residuos de aminoácidos se encuentran entre la puntuaciones -0,1 hasta +0,65 aproximadamente. De estos residuos, el 78,52 % presentan un “puntaje promedio 3D-1D” $\geq +0,2$, y pocos residuos presentaron puntajes negativos.

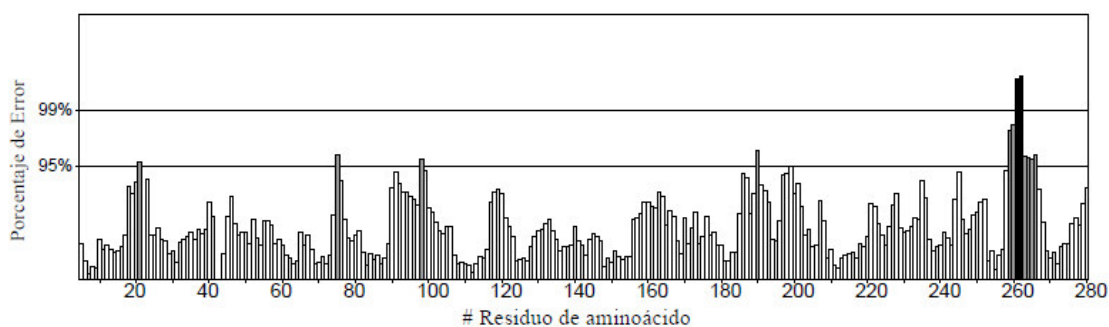


Figura N° 22. Diagrama ERRAT (Colovos & Yeates, 1993) para la lipasa modelada de *Marinobacter* sp. LB. Las barras blancas representan regiones con menor tasa de error para el plegamiento de proteínas, las negras indican regiones plegadas de manera errónea y las grises representan regiones con error entre el 95 y 99%.

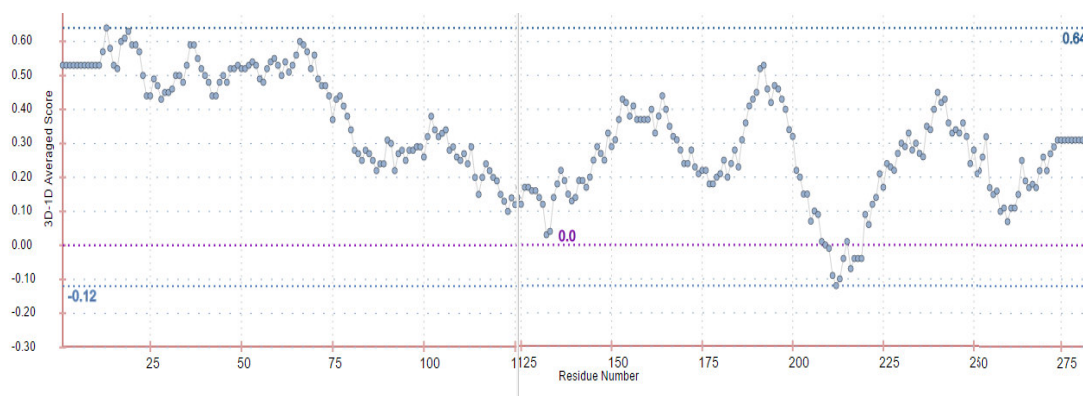


Figura N° 23. Diagrama de compatibilidad entre la estructura 3D y 1D de la lipasa modelada de *Marinobacter* sp. LB. Los valores máximos de los puntajes son +1 (buen puntaje) y -1 (mal puntaje). La mayor cantidad de puntajes positivos, mayor la probabilidad de haber realizado un buen modelado de proteínas.

4.1.10.2. Acoplamiento molecular

El proceso de validación del programa HEX (Ritchie *et al.*, 2008) se realizó empleando 2000 soluciones de acoplamiento, donde se reprodujo el acoplamiento de las lipasas 1EX9, 1YS1 y 1HQD con sus respectivos sustratos, dando energías de acoplamiento bajas, lo que significa que existe una alta probabilidad para estas interacciones. Con el uso del programa Discovery Studio 2017 R2 (Dassault Systèmes BIOVIA, San Diego, CA, USA), se encontró que varios aminoácidos de cada bolsillo de unión de las estructuras cristalográficas también participaban del reconocimiento de los ligandos en los modelos pronosticados (Tabla N° 10), demostrando que el programa pronostica análisis de acoplamiento muy cercanos a los resultados experimentales.

El acoplamiento molecular entre la lipasa modelada de *Marinobacter* sp. LB y tributirina (CID: 6050) evidenció el posible bolsillo catalítico de la enzima, quien presentó una abertura en la superficie tridimensional que

permite el ingreso del sustrato (Figura N° 24), adicionalmente el programa determinó una energía total de unión de acoplamiento -248.11 kcal/mol.

Tabla N° 10. Lipasas utilizadas en la validación del programa HEX

Bacteria	Sustrato	Energía de acoplamiento (Kcal/mol) ¹	Aminoácidos que coinciden en los bolsillos de unión ²
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	RC-(RP,SP)-1,2-dioctil carbamoil-glicero-3-O-octilfosfonato	-390.15	Ser82, Met16, Leu118
<i>Burkholderia cepacia</i>	ácido hexilfosfónico (R)-2-metil-3-fenil propil ester	-256.14	Gln88, Leu17, Leu167
<i>Pseudomonas cepacia</i>	1-fenoxi-2-acetoxibutano	-216.50	Leu167, Leu17

¹, Determinado por el programa HEX 8.0.0 (Ritchie *et al.*, 2008)

², Bolsillos de unión de la estructura cristalina y pronóstico del HEX 8.0.0 (Ritchie *et al.*, 2008)

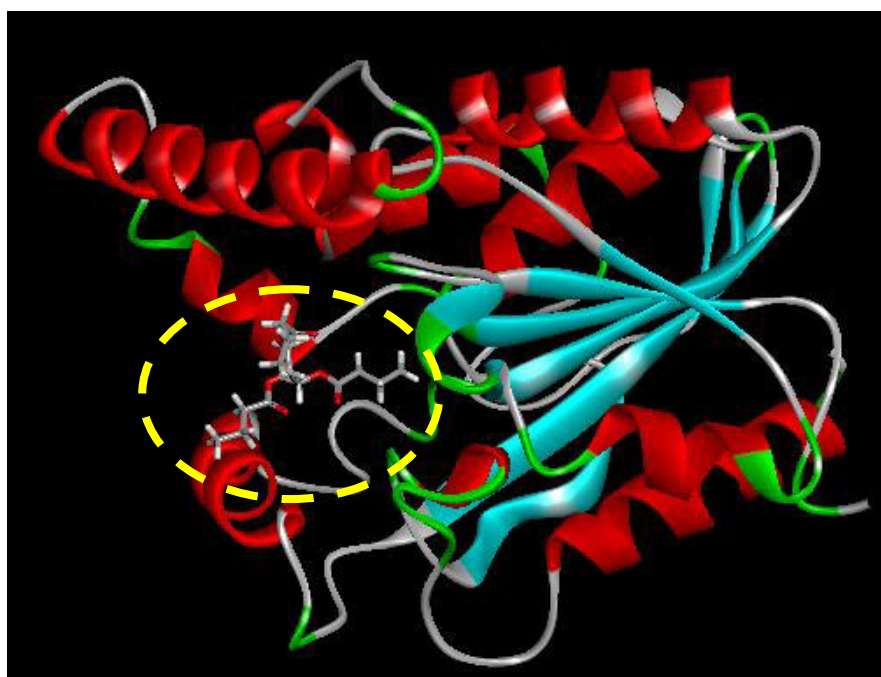


Figura N° 24. Región del sitio activo de la lipasa de *Marinobacter* sp. LB pronosticado con el programa HEX (Ritchie *et al.*, 2008) y presentada con Discovery Studio 2017 R2 (Dassault Systèmes BIOVIA, San Diego, CA, USA). Presencia de tributirina dentro del círculo amarillo.

En la figura N° 25, se observa la posible interacción enzima-sustrato, en donde la Thr16 genera un puente de hidrógeno, mientras que la His77, His251, Ile255 y Tyr27 generan interacciones alquilo y por último la Ser78, Leu231 y Val252, forman interacciones de Van Der Waals con la tributirina.

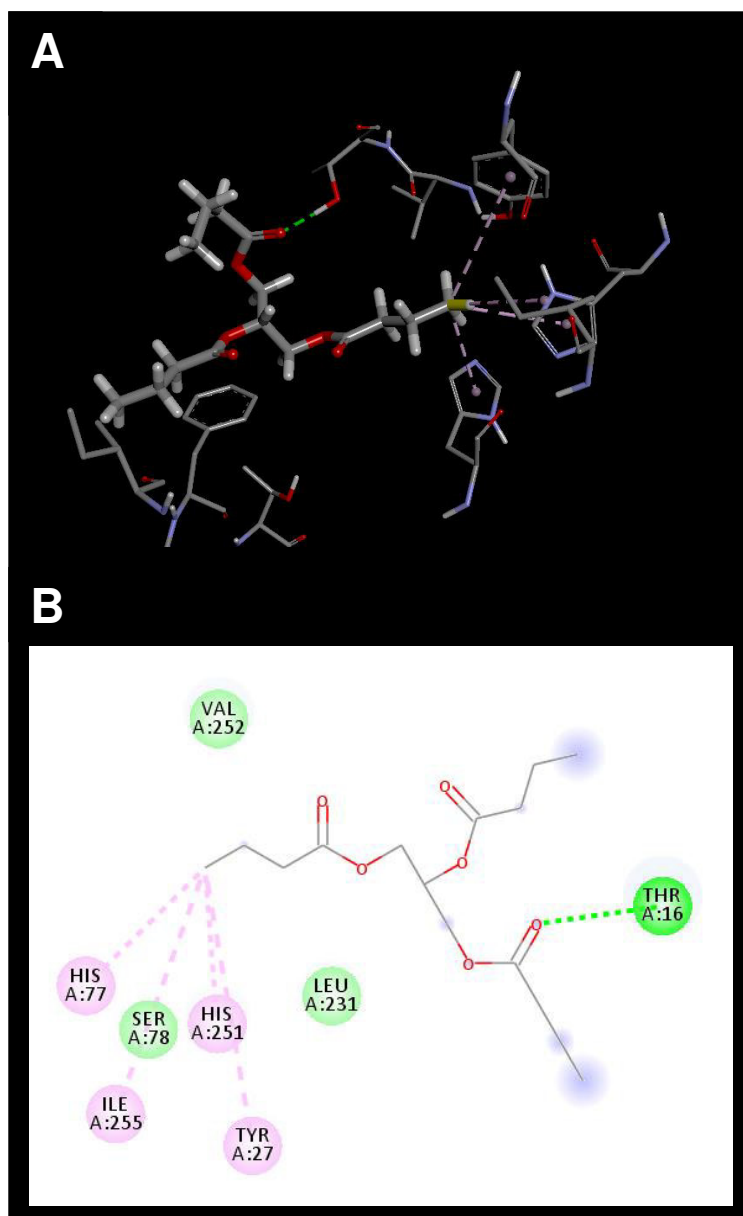


Figura N° 25. A. interacción entre la tributirina y los aminoácidos del bolsillo de interacción de la lipasa de *Marinobacter* sp. LB generada por HEX (Ritchie *et al.*, 2008) y presentada con Discovery Studio 2017 R2 (Dassault Systèmes BIOVIA, San Diego, CA, USA). B, vista detallada de aminoácidos que participan en el bolsillo de interacción. Líneas verde oscuro, puentes de hidrógeno; líneas rosadas, interacciones alquilo; líneas verde claro, interacciones Van Der Waals.

4.2. DISCUSIÓN

Hoy en día existen varios métodos para la extracción de ADN bacteriano, tales como Salt in, Chelex, Fenol-Cloroformo, Kit comercial, método convencional, entre otros. La técnica de extracción por choque térmico empleada en nuestras pruebas resultó efectiva, obteniendo gran cantidad de ADN genómico íntegro, el cual permitió realizar las amplificaciones de los genes ribosómicos *16S*, *glut* y *lip* de *Marinobacter* sp. LB.

La amplificación de los genes ribosómicos 16S permitió obtener una secuencia de ADN de 1500 pb aproximadamente, tamaño de la mayoría de los genes ribosómicos 16S bacterianos, similar a lo obtenido por Wang *et al.*, (2008) y Park *et al.*, (2009). En el caso del gen *glut*, el tamaño del producto fue de 770 pb debido a que la secuencia obtenida, solamente es un segmento ubicado en inicio del gen, el cual tiene más de 900 pb según lo descrito por Kronemeyer, Peekhaus, Krämer Sahn & Eggeling (1995) quienes caracterizaron los genes *gluABCD* de *Corynebacterium glutamicum*.

Una de las técnicas más utilizadas para la amplificación del gen *lip* bacteriano, es el uso de genotecas (Jorgensen *et al.*, 1991; Frenken *et al.*, Tan & Miller, 1992). No obstante, el desarrollo de nuevas técnicas de PCR, las bases de datos y la bioinformática, permiten actualmente desarrollar metodologías rápidas para la obtención de secuencias de interés (Kim *et al.*, 1994; Ruíz *et al.*, 2002; An *et al.*, 2003; Aysun, 2009; Jimenez *et al.*, 2010; Sangeetha *et al.*, 2014). En este trabajo se diseñaron 15 pares de cebadores, tomando como base las secuencias genómicas de las especies *Marinobacter algicola* (DG893), *Marinobacter adhaerens* (P15) y *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (ATCC49850), de todos los cebadores solamente cinco fueron seleccionados para su síntesis, los cuales se

encontraban ubicados en regiones internas y externas de gen *lip*. El oligonucleótido que logró hibridizar al ADN genómico de *Marinobacter* sp. LB fue el par 2 (FMlip2 5'-ATACTCCCTGTTGCATGTCG-3', RMLip2 5'-TGGACTGGTGCTTCATAACC-3') obteniendo en el gel de agarosa una banda de 998 pb aproximadamente, después del secuenciamiento y eliminando las secuencias flanqueadoras del gen *lip*, se obtuvo un segmento de 927 pb desde el codón de inicio hasta el de término, similar al tamaño de los genes *lip* de *Pseudomonas glumae* PG1 con 1077 pb (Frenken *et al.*, 1992), *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 con 936 pb (Oshima-Hirayama *et al.*, 1993) y *Pseudomonas fragi* IFO 12049 con 1050 pb (Kim *et al.*, 1994).

El primer análisis filogenético del gen ribosómico 16S, ubicó a la cepa *Marinobacter* sp. LB junto a *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* P721 y *Marinobacter alkaliphilus* 2PR56-13. Sin embargo, al realizar un segundo árbol con diferentes cepas de las especies ya mencionadas, el programa evidencio un clado robusto dentro de las cepas de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* dejando a *Marinobacter alkaliphilus* 2PR56-13 como un grupo externo de la especie.

El tercer análisis con el gen parcial de la glutamato sintetasa (*gluB*), generó un clado robustecido con 95 %, dentro del cual se encontraban las especies *Marinobacter* sp. LB, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* ATCC49840 y *Marinobacter aquaeolei* VT8, dejando fuera a las especies *Maribonacter adhaerens* HP15, *Marinobacter salarius* R9SW1 y *Marinobacter similis* A3d10. Las bases de datos de libre acceso brindan información muy importante para diversos estudios. Sin embargo, se sabe que pueden existir errores en la clasificación y anotación de especies, más aún en bacterias que tienen alto grado de similitud en las secuencias de los genes ribosómicos 16S. Tal es el caso de *Marinobacter aquaeolei* VT8, pues Márquez y Ventosa el 2005 publicaron la reclasificación de esta especie describiéndola como *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (Marquéz & Ventosa, 1992).

La confluencia de los análisis filogenéticos de los genes ribosómicos *16S* y *glut*, permiten asegurar que la cepa *Marinobacter* sp. LB aislada de las Salinas de Pilluana presenta alto grado de similitud con *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, motivo por el cual se propone clasificar a esta cepa como *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* LB1.

En cuanto al gen *lip*, los análisis evolutivos indican que las lipasas del género *Marinobacter* están muy cercanas a las del género *Pseudomonas* (pertenecientes a las verdaderas lipasas). A excepción de *Marinobacter similis* A3d10 y *Pseudomonas mendocina* NK-01, las cuales fueron agrupadas en otro clado muy diferenciado junto con *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, *Rhodoferax ferrireducens* T118 y *Klebsiella michiganensis* RC10. Debido a que no existen estudios referentes a las lipasas de estas últimas especies mencionadas, no podemos aseverar a que familia de lipasas pertenecen. Sin embargo, existe una diferencia evolutiva entre ambos clados.

El alineamiento de los aminoácidos entre las lipasas de *Marinobacter* sp. LB con las de otras especies, permite evidenciar la presencia de regiones conservadas de la Familia I de las lipasas. Tal es el caso del pentapeptido Gly-X-Ser-X-Gly, la región Asn-Asp-Gly-Leu-Val y la secuencia Asn(Asp)-His-Leu-Asp, los cuales contienen a los aminoácidos catalíticos tales como la serina (Ser), ácido aspártico (Asp) e histidina (His), respectivamente. Dichas regiones características de la Familia I, fue propuesta por Arpigny & Jaeger (1999), donde también mencionaron que ésta familia podría estar conformada por las subfamilias 1 (verdaderas lipasas), 2, 3, 4, 5 (fosfolipasas) y 6.

El número de aminoácidos de nuestra lipasa inmadura es de 308 residuos, el tamaño de éstas enzimas depende de: la familia a la que pertenece, la especie, y del lugar donde actúan. Así pues, las lipasas extracelulares, por lo general presentan un péptido señal (Park *et al.*, 2009) (25, 26, 36-51) en la región N-terminal que son reconocidas por receptores de membrana que permiten la salida de la enzima al medio externo a través de una maquinaria proteica de secreción (Jaeger *et al.*, 1999). En tal sentido, el reconocimiento de un péptido señal de 24 aminoácidos en nuestra lipasa, se sustenta en los trabajos realizados por Chavez (2010) y Alejandro-Paredes (2012), quienes demuestran que la lipasa de *Marinobacter* sp. LB es extracelular, lo cual la hace un blanco de estudio interesante para su desarrollo biotecnológico.

La secuencia madura de la Lipasa de *Marinobacter* sp. LB, presenta 284 residuos, con un peso molecular de 29,99 kDa y punto isoeléctrico de 8,89. Sus aminoácidos catalíticos son serina 78, ácido aspártico 229 e histidina 251, mientras que los residuos de ácido aspártico de unión al Ca^{2+} se encuentran en las posiciones 210 y 253. Resultados similares fueron encontrados por: Ihara *et al.* (1991) quienes encontraron dos lipasas de *Pseudomonas* nov. Sp. 109 y una de ellas presentó en la secuencia madura 311 aminoácidos con un peso molecular de 30,149 kDa y un punto isoeléctrico de 7; Frenken *et al.* (1992) caracterizaron una lipasa de *Pseudomonas glumae* PG1, cuya secuencia madura de 319 aminoácidos tuvo un peso molecular de 33,1 kDa y punto isoeléctrico de 7,2. Sus residuos catalíticos son serina 87, ácido aspártico 241 e histidina 285; Sullivan *et al.* (1999) evidenciaron una lipasa de *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 con un tamaño de 313 aminoácidos, un peso de 32,5 kDa y punto isoeléctrico de 6,16. Los residuos de ácidos aspártico de unión al Ca^{2+} se encuentran en la posiciones 240 y 281, mientras que sus residuos catalíticos fueron serina 111, ácido aspártico 258 e histidina 280; Alquati *et al.* (2002) encontraron una lipasa de *Pseudomonas fragi* IFO 3458 con 293 aminoácidos y un peso de 32,086 kDa y punto isoeléctrico de 9,33, también evidenciaron la presencia de la triada catalítica serina 83, ácido aspártico 238 e histidina

260; An *et al.*, en el 2003 identificaron una lipasa y su activador en *Pseudomonas* sp. SW-3, la enzima presentó 311 aminoácidos con residuos catalíticos de serina 108, ácido aspártico 255 e histidina 277, y sus residuos de unión al Ca^{2+} fueron los ácidos aspárticos 240 y 279. El peso molecular, fue calculado, a partir de geles de poliacrilamida desnaturalizante, resultando una enzima de 31 kDa; Park *et al.* (2008) caracterizaron una lipasa de *Acinetobacter baumannii* BD5 con una secuencia de 325 aa, en donde la serina se encontró dentro del pentapéptido conservado Gly-X-Ser-X-Gly y los otros dos residuos fueron ácido aspártico 269 e histidina 291, con un peso molecular de 36 kDa por análisis *In silico* y 35 kDa expresando la proteína y análisis PAGE; Sangeetha *et al.* (2014) caracterizaron una lipasa de la Familia I, subfamilia 4 de *Bacillus pumilus* SG2 con una secuencia madura de 177 residuos con aminoácidos catalíticos en las posiciones serina 77, ácido aspártico 133 e histidina 156; De manera similar; Perez *et al.* (2011) aislaron y caracterizaron una nueva lipasa de tipo esterasa de la familia VIII perteneciente a *Marinobacter lipolyticus* SM19, el tamaño de la enzima fue de 404 aminoácidos con peso molecular de 45,2 kDa y un punto isoeléctrico de 6,22. Cabe resaltar que en este tipo de lipasa, el aminoácido catalítico Serina 321 también se encuentra dentro del pentapéptido conservado (Pérez *et al.*, 2011).

Al realizar el modelado tridimensional, se identificó 11 α -Hélice presentes de manera radial y 9 Lámina- β ubicadas básicamente en una sola región dentro de la estructura de la Lipasa de *Marinobacter* sp. LB, similar a lo descrito por Messaoudi *et al.* (2011) quienes describen en su modelo 8 láminas- β centrales. Para que la enzima pueda plegarse y estabilizarse es necesario: la interacción puentes de hidrógeno, entre aminoácidos polares; interacción hidrofóbica, entre los residuos apolares como la glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina entre otros; Y los puentes disulfuros, en nuestra secuencia el 0,6 % de cisteína, representa dos aminoácidos en las posiciones 180 y 235, por lo que la estructura tridimensional debería contar por lo menos con un enlace entre los grupos tiol (-SH) de éstos residuos, similar a lo encontrado por Frenken *et al.* (1992), An *et al.* (2003),

Sangeetha *et al.* (2014) y Sullivan *et al.* (1999). En relación al RMSD, los modelos que presentan un porcentaje de identidad entre 90% a 95%, suelen tener valores entre 1 y 0,5 Å (Rost 1999, Vivas-Reyes *et al.* 2010), por lo que puntuaciones inferiores a 0,5 Å deben considerarse estructuralmente confiables, tal como sucede con el valor de 0,32 Å obtenido con Swiss-PDB Viewer (Guex & Peitsch, 1997).

Para validar el modelado de la Lipasa de *Marinobacter* sp. LB, la estructura fue analizada con el programa RAMPAGE, en donde la gráfica se dividió en tres regiones bien diferenciadas: favorecida (92,6 %), permitida (6 %) y atípica (1,4 %). Cabe resaltar que el programa recomienda valores aproximados al 98 % en la región favorecida, sin embargo, el puntaje obtenido es aceptable por ser un modelo predictivo y no una estructura cristalográfica completamente resuelta (Ali *et al.*, 2013). El programa ERRAT (Colovos & Yeates, 1993) asignó un “Factor de calidad general” de 95,604 % que indica un buen modelo estructural debido a que el programa recomienda valores superiores a 95 %. A pesar de esto, se han validado estructuras con 84.67% (Lanka *et al.*, 2015). Como último programa se utilizó Verify 3D (Bowie *et al.*, 1991; Lüthy *et al.*, 1992), el cual indicó que el 78,52 % de los aminoácidos presentan un “puntaje promedio 3D-1D” mayor a +0,2, los reportes de Bowie *et al.* (1991) y Lüthy *et al.* (1992), indican que por lo menos se requiere el 65 % de aminoácidos con puntajes mayores a +0,2, indicando una buena relación entre el diseño tridimensional y la estructura primaria de la enzima. Así, todos los análisis reflejan un modelo predictivo adecuado de la lipasa de *Marinobacter* sp. LB aislado de las Salinas de Pilluna.

En el análisis de acoplamiento la tributirina se unió al bolsillo de interacción mediante los aminoácidos Thr16, Try27, His77, Ser78, Leu231, His251, Val252 e Ile255, que generaron diferentes interacciones con el sustrato. Cabe resaltar que los aminoácidos Ser78 e His251, pertenecen a la triada catalítica de las lipasas. La energía de acoplamiento fue de -248,11 kcal/mol. Resultados similares fueron obtenidos por Messaoudi *et al.* (2011)

quienes realizaron el acoplamiento entre una lipasa de *Arabidopsis thaliana* con los sustratos de tributirina, trioctanoína y trioleína obteniendo energías de unión de -201,09; -191,11 y -272,83 kcal/mol, indicando que el sustrato con mayor afinidad para su enzima fue la trioleína por presentar menor energía de acoplamiento. Comparado con nuestro resultado, la unión de nuestra lipasa con la tributirina tampoco requiere un desgaste energético elevado, indicando una buena afinidad de la enzima por su sustrato, puesto que a menor energía utilizada en la unión existe mayor probabilidad de acoplamiento (Ritchie *et al.*, 2008).

CONCLUSIONES

- De todos los cebadores diseñados para la amplificación del gen *lip* de *Marinobacter* sp. LB el par FMlip2 5'-ATACTCCCTGTTGCATGTTCG-3' y RMlip2 5'-TGGACTGGTGCTTCATAACC-3', fue el adecuado para obtener un producto amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa.
- La amplificación y secuenciación del gen *lip* permitió obtener un producto de génico de 927 pb desde el codón de inicio hasta el de término.
- Los análisis *in silico* elucidaron que la lipasa de *Marinobacter* sp. LB, pertenece a la familia I, subfamilia 1 de las verdaderas lipasas, con un peso molecular de 29,99 kDa y pl 8,89. Su estructura terciaria contiene 11 α -hélices y 9 láminas- β , estabilizadas por puentes disulfuro, hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de Van Der Waals, siendo sus potenciales residuos catalíticos serina 78, ácido aspártico 229 e histidina 251.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alejandro-Paredes, A. (2012). Producción en cultivo discontinuo y caracterización parcial de lipasas de *Marinobacter* sp. aislada de las salinas de Pilluana [Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico]. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Ali, M.S.M., Fuzi, S.F.M., Ganasen, M., Rahman, R.N.Z.R.A., Basri, M. & Salleh, A.B. (2013). Structural Adaptation of Cold-Active RTX Lipase from *Pseudomonas* sp. Strain AMS8 Revealed via Homology and Molecular Dynamics Simulation Approaches. *BioMed Res Int.* 2013, 1-9.

Alquati, C., De Gioia, L., Santarossa, G., Alberghina, L., Fantucci, P. & Lotti, M. (2002). The cold-active lipase of *Pseudomonas fragi*. Heterologous expression, biochemical characterization and molecular modeling. *Eur J Biochem.* 269, 3321-3328.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215(3), 403-10.

An, S.Y., Kim, S-W., Choi, Y.L., Cho, Y.S., Joo, W.H. & Lee, Y.C. (2003). Cloning, expression in *Escherichia coli*, and enzymatic properties of a lipase from *Pseudomonas* sp. SW-3. *J Microbiol.* 41, 95-101.

Arpigny, J.L. & Jaeger, K.E. (1999). Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. *Biochem J.* 343, 177-183.

Aysun, A. (2009). Isolation and identification of a lipase producing psychrotrophic bacteria from soil: cloning and partial characterization of its lipase (Master of Science). Izmir Institute of Technology, Turquía.

Bowie, J.U., Lüthy, R. & Eisenberg, D. (1991). A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science.* 253(5016), 164-70.

Brumlik, M.J. & Buckley, J.T. (1996). Identification of the catalytic triad of the lipase/acyltransferase from *Aeromonas hydrophila*. *J Bacteriol.* 178, 2060-2064.

Chavez, E. (2010). Bacterias halófilas moderadas con actividad lipolítica aisladas de las Salinas de Pilluana – San Martín (Tesis para optar al Grado de Magíster en Biotecnología). Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Colovos, C. & Yeates, T.O. (1993). Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci.* 2(9), 1511-1519.

Cruz, H., Pérez, C., Wellington, E., Castro, C. & Servín-González, L. (1994). Sequence of the *Streptomyces albus* G lipase-encoding gene reveals the presence of a prokaryotic lipase family. *Gene.* 144(1), 141-142.

Fernández-Jerí, Y., Zavaleta, A.I., Alejandro-Paredes, L. & Izaguirre, V. (2013). Caracterización parcial de una lipasa extracelular de *Marinobacter* sp. empleando la metodología de superficie respuesta. *Ciencia e Investigación.* 16, 12-17.

Frenken LGJ, Egmond MR, Batenburg AM, Bos JW, Visser C, Verrips CT. Cloning of the *Pseudomonas glumae* lipase gene and determination of the active site residues. *Appl Environ Microb.* 58, 3787-3791.

Guex, N. & Peitsch, M.C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* 18(15), 2714-2723.

Gupta, G.N., Singh, V.K. & Prakash, V. (2015). Molecular modeling and docking studies of cold active lipase from *Pseudomonas fluorescens*. *Int J Appl Biol Pharm.* 6, 59-66.

Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser.* 41, 95-98.

Hasan, F., Shah, A.A. & Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Technol.* 39, 235-251.

Hemilä, H., Koivula, T.T. & Palva, I. (1994). Hormone-sensitive lipase is closely related to several bacterial proteins, and distantly related to acetylcholinesterase and lipoprotein lipase: Identification of a superfamily of esterases and lipases. *Biochim Biophys Acta.* 1210(2), 249-253.

Houde, A., Kademi, A. & Leblanc, D. (2003). Lipases and their industrial applications. *Appl Biochem Biotechnol.* 118, 155-170.

Ihara, F., Kageyama, Y., Hirata, M., Nihira, T. & Yamada, Y. (1991). Purification, characterization, and molecular cloning of lactonizing lipase from *Pseudomonas species*. *J Biol Chem.* 266, 18135-18140.

Jaeger, K.E., Dijkstra, B.W. & Reetz, M.T. (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol.* 53, 315-351.

Jaeger, K-E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., Van Heuvel, M. & Misset, O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS Microbiol Rev.* 15, 29-63.

Jimenez, K., Zavaleta, A.I., Izaguirre, V., Yarleque, A. & Inga, R. (2010). Clonaje y caracterización molecular in silico de un transcrito de fosfolipasa A2 aislado del veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta*. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* 27. 532-39.

Jorgensen, S., Skov, K. & Diderichsen, B. (1991) Cloning, sequence, and expression of a lipase gene from *Pseudomonas cepacia*: Lipase production in heterologous hosts requires two *Pseudomonas* genes. *J Bacteriol.* 173, 559-567.

Kasuya, K., Takano, T., Tezuka, Y., Hsieh, W.C., Mitomo, H. & Doi, Y. (2003). Cloning, expression and characterization of a poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Marinobacter* sp. NK-1. *Int J Biol Macromol.* 33, 221-226.

Kim, H.K., Jung, Y-J., Choi, W-C., Ryu, H.S., Oh, T-K. & Lee J-K. (2004). Sequence-based approach to finding functional lipases from microbial genome databases. *FEMS Microbiol Lett.* 235, 349-355.

Kim, K.K., Song, H.K., Shin, D.H., Hwang, K.Y. & Choe, S. (1997). Crystal structure of carboxylesterase from *Pseudomonas fluorescens*, an α/β hydrolase with broad substrate specificity. *Structure.* 5, 1571-1584.

Kim, K.K., Song, H.K., Shin, D.H., Hwang, K.Y. & Suh, S.W. (1997). The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure.* 5:173-85.

Kim, T.R., Park, S.H., Yang, C.H. (1994). Cloning and expression of lipase from *Pseudomonas fragi* as fusion protein in *Escherichia coli*. *Korean Biochem J.* 27, 13-16.

Koressaar, T. & Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics.* 23(10), 1289-1291

Kronmeyer, W., Peekhaus, N., Krämer, R., Sahm, H. & Eggeling, L. (1995). Structure of the gluABCD Cluster Encoding the Glutamate Uptake System of *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol.* 177, 1152-1158.

Lang, D., Hofmann, B., Haalck, L., Hecht, H-J. & Spener, F. (1996). Crystal structure of a bacterial lipase from *Chromobacterium viscosum* ATCC 6918 refined at 1.6 °Å resolution. *J Mol Biol.* 259, 704-17.

Langin, D., Laurell, H., Holst, L.S., Belfrage, P. & Holm, C. (1993). Gene organization and primary structure of human hormonesensitive lipase: possible significance of a sequence homology with a lipase from *Moraxella* TA144, an Antarctic bacterium. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90, 4897-901.

Lanka, S., Talluri, V.R., Ganesh, V. & Latha, J.N.L. (2015). Homology Modeling, Molecular Dynamic Simulations and Docking Studies of a New Cold Active Extracellular Lipase, EnL A from *Emericella nidulans* NFCCI 3643. *Trends Bioinform.* 8(2), 37-51.

Louwrier, A. (1998). Industrial products: the return to carbohydrate-based industries. *Biotechnol Appl Biochem.* 27, 1-8.

Lüthy, R., Bowie, J.U. & Eisenberg, D. (1992). Assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Nature.* 356(6364), 83-5.

Márquez, M.C. & Ventosa, A. (2005). *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* Gauthier et al. 1992 and *Marinobacter aquaeolei* Nguyen et al. 1999 are heterotypic synonyms. *Int J Syst Evol Microbiol.* 55, 1349-1351.

Messaoudi, A., Belguith, H. & Hamida, J.B. (2011). Three-Dimensional Structure of *Arabidopsis thaliana* Lipase Predicted by Homology Modeling Method. *Evol Bioinform.* 7, 99-105.

Misawa, E., Chion C.K., Archer, I.V., Woodland, P.M., Zhou, N.Y., Carter, S.F., Widdowson, D.A. & Leak D.J. (1998). Characterisation of a catabolic epoxide hydrolase from a *Corynebacterium* sp. *Eur J Biochem.* 253, 173-183.

Monsia, T. & Monsia, P. (2013). A review on “microbial lipase-versatile tool for industrial applications”. *Int J LifeSc Bt & Pharm Res.* 2, 1-16.

Ollis, D.L., Shea, E., Cygler M, Dijkstra, B. & Frolow F. (1992). The α/β hydrolase fold. *Protein Eng.* 5, 197-211.

Oshima-Hirayama, N., Yoshikawa, K., Nishioka, T. & Oda, J. (1993). Lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. Production in *Escherichia coli* and activation in vitro with a protein from the downstream gene. *Eur J Biochem.* 215, 239-246.

Park, I.H., Kim, S.H., Lee, Y.S., Lee, S.C., Zhou, Y., Kim, C.M., Ahn, S.C. and Choi, Y.L. (2009). Gene Cloning, Purification, and Characterization of a Cold-Adapted Lipase Produced by *Acinetobacter baumannii* BD5. *J Microbiol Biotechnol.* 19(2), 128-135.

Pérez, D., Martín, S., Fernández-Lorente, G., Filice, M., Guisán, J.M., Ventosa, A., García, M.T. & Mellado, E. (2011). A novel halophilic lipase, lipBL, showing high efficiency in the production of eicosapentaenoic acid (EPA). *PLos ONE.* 6(8), e23325.

Petersen, T.N., Brunak, S., Heijne, G. & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*. 8, 785-786.

Rabbani, M., Shafiee, F., Shayegh, Z., MirMohammadSadeghi, H., Shariat, Z.S., Etemadifar, Z. & Moazena, F. (2015). Isolation and Characterization of a new thermoalkalophilic lipase from soil bacteria. *Iran J Pharm Res*. 14, 901-906.

Ritchie, D.W., Kozakov, D. & Vajda, S. (2008). Accelerating and Focusing Protein-Protein Docking Correlations Using Multi-Dimensional Rotational FFT Generating Functions. *Bioinformatics*. 24, 1865-1873.

Rost, B. (1999). Twilight zone of protein sequence alignments. *Protein Eng*. 12, 85-94.

Ruiz, C., Blanco, A., Pastor, F.I. & Diaz, P. (2002). Analysis of *Bacillus megaterium* lipolytic system and cloning of LipA, a novel subfamily I.4 bacterial lipase. *FEMS Microbiol Lett*. 217, 263-267.

Saeed, H.M., Zaghloul, T.I., Khalil, A.I. & Abdelbaeth M.T. (2006). Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of *Pseudomonas aeruginosa* lipase gene. *Biotechnology*. 5, 62-68.

Saengsanga, T., Siripornadulsil, W. & Siripornadulsil, S. (2016). Molecular and enzymatic characterization of alkaline lipase from *Bacillus amyloliquefaciens* E1PA isolated from lipid-rich food waste. *Enzyme Microb Technol*. 82, 23-33.

Sangeetha, R., Arulpandi, I. & Geetha, A. (2014). Molecular characterization of a proteolysis-resistant lipase from *Bacillus pumilus* SG2. *Braz J Microbiol*. 45(2), 389-393.

Schiraldi, C., Giuliano, M. & De Rosa, M. (2002). Perspectives on biotechnological applications of archaea. *Archaea*. 1(2), 75-86.

Sullivan, E.R., Leahy, J.G. & Colwell, R.R. (1999). Cloning and sequence analysis of the lipase and lipase chaperone encoding genes from

Acinetobacter calcoaceticus RAG-1, and redefinition of a Proteobacterial lipase family and an analogous lipase chaperone family. *Gene*. 230, 277-285.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol*. 28(10), 2731-2739.

Tan, Y. & Miller, K.J. (1992). Cloning, expression, and nucleotide sequence of a lipase gene from *Pseudomonas fluorescens* B52. *Appl Environ Microb*. 58, 1402-1407.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D.G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 25(24), 4876-82.

Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M. & Rozen, S.G. (2012). Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*. 40(15), e115.

Verschueren, K.H., Seljée, F., Rozeboom, H.J., Kalk, K.H. & Dijkstra, B.W. (1993). Crystallographic analysis of the catalytic mechanism of haloalkane dehalogenase. *Nature*. 363(6431), 693-8.

Vivas-Reyes, R., Ahumado, M. & Cabezas, J. (2010). Modelamiento por homología de la estructura tridimensional de la fosfolipasa A2 citosólica pancreática dependiente de calcio presente en *Rattus norvegicus*. *Rev Colomb Quim*. 39(2), 181-197.

Wang, C., Guo, R., Yu, H. & Jia, Y. (2008). Cloning and sequence analysis of a novel cold-adapted Lipase Gene from strain lip35 (*Pseudomonas* sp.). *Agr Sci China*. 7, 1216-1221.

Wohlfarth, S., Hoesche, C., Strunk, C. & Winkler, U.K. (1992). Molecular genetics of the extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa* PAOI. *J Gen Microbiol*. 138, 1325-1335.

Xia, X. (2013). DAMBE5: A Comprehensive Software Package for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. *Mol Biol Evol.* 30(7), 1720-1728.

ANEXOS

Anexo N° 1: Stock de agua de sales (SW) al 30 % (p/v)

Reactivo	Peso (g)
NaCl	240
MgCl ₂ .6H ₂ O	30
MgSO ₄ .7H ₂ O	35
KCl	7
NaBr	0,8
NaHCO ₃	0,2
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,5

Anexo N° 2: Alineamiento de secuencias nucleotídicas de los genes ribosómicos 16S del género *Marinobacter* con la cepa *Marinobacter* sp. LB y *Salinibacter ruber* M31. Los (*) representan los sitios conservados en todas las secuencias alineadas. Los (-) indican la presencia de gaps.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Marinobacter_articus	AGCGG	TAA	CAGGT	---	CCTTCGGGATGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC				
Marinobacter_maritimus_CK47T	AGCGG	AAACGATGGGAGCTTTGCTACCCGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC							
Marinobacter_sediminum_R65	AGCGG	TAA	CAGGGGTAGCTTGTACCCGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC						
Marinobacter_goseongensis_En6	AGCGG	TAA	CAGGGGTGCTTGACCCCGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC						
Marinobacter_guineae_LGM24048	AGCGG	TAA	CAGGT	---	CCTTCGGGATGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC				
Marinobacter_taiwanensis_GI-17	AGCGG	AAACGATGGTCTTGACCCGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC							
Marinobacter_zhejiangensis_CN7	AGCGG	TAA	CAGGGGTAGCTTGTACCCGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC						
Marinobacter_sp._LB	AGCGG	TAA	CAGGGGTAGCTTGTACCCGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC						
Marinobacter_bryozoorum_PTG4-1	AGCGG	TAA	CAGGGGTGCTTGACCCCGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC						
Marinobacter_lacisalsi_FP2.5	AGCGG	AAACAGGGGGAGCTTGTCCCGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC							
Marinobacter_salsuginis_SD-14	AGCGG	TAA	CAGGGGTGCTTGACCCCGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC						
Marinobacter_zhanjiangensis_JS	AGCGG	AAACAGGGGGTGTTCACCTCGTGTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC							
Marinobacter_koreensis_KGB22	AGCGG	TAA	CAGGGGGAGCTTGTCCCGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC						
Marinobacter_algicola_DG893	AGCGG	TAA	CAGGGGGAGCTTGTCCCGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC						
Marinobacter_excellens_KMM3809	AGCGG	TAA	CAGATCTAGCTTGTAGTGTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC						
Marinobacter_litoralis_SW-45	AGCGG	AAACGATGATAGCTTGTATCAGCGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC							
Marinobacter_vinifirmus_FB1	AGCGG	TAA	CAGGGGTGCTTGACCCCGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC						
Marinobacter_bacchus_FB3	AGCGG	TAA	CAGGGGTGCTTGACCCCGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC						
Marinobacter_alkaliphilus_2PR5	AGCGG	TAA	CAGGGGTGCTTGACCCCGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC						
Marinobacter_flavimaris_2PR54-	AGCGG	TAA	CAATGGGTGCTTGACCCCGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC						
Marinobacter_kribbensis_Isol7	AGCGG	TAA	CAGGGGTGCTTGACCCCGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC						
Marinobacter_daepoensis_SW-156	AGCGG	TAA	CAGGGGTAGCTTGTACCCCGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC						
Marinobacter_guadonensis_SL014	AGCGG	TAA	CAGGGGGAGCTTGTCCCGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC						
Marinobacter_bryozoorum_FR53-1	AGCGG	TAA	CAGGGGTGCTTGACCCCGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC						
Marinobacter_segnicrescens_MP	AGCGG	TAA	CAGGGGTGCTTGACCCCGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC						
Marinobacter_aquaeolei	---	CGG	TNACAGGGGGTCTTGACCCCGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC						
Marinobacter_lutaeensis_T5054	AGCGG	TAA	CAGGGGGAGCTTGTCCCGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC						
Marinobacter_hydrocarbonoclast	AGCGG	TAA	CAGGGGTGCTTGACCCCGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC						
Marinobacter_santoriniensis_NK	AGCGG	TAA	CAGATCCAGCTTGTGATGTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC						
Marinobacter_mobilis_B17	AGCGG	TAA	CAGGGGGTCTTGACCCCGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC						
Marinobacter_saliocampi_ISL-40	AGCGG	AAACGATGGGAGCTTGTACCCCGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC							
Marinobacter_psychrophilus_BSI	GGCGG	AAACGATGGTAGCTTGTACCCCGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC							
Marinobacter_lipolyticus_SM-19	AGCGG	TAA	CAGGGGGAGCTTGTCCCGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC						
Marinobacter_haloterrigenus_FP	AGCGG	AAACAGGGGGAGCTTGTCCCGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC							
Marinobacter_sztusaonensis_NTU	AGCGG	TAA	CAGGGGTGCTTGACCCCGCTGACGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGG	AACTCGCCCTGGTAGTGGGGGATAGCCGGGGAAACC						
Salinibacter_ruber_M31	CACGA	GAACGTTCTGGCTTTCAGGACAACTACAGTGGCGGACGGGTGCGTATCGCTAGATAACCTGCCCTCAGGCGGGACAACTACAGGGAACCC								
Clustal Consensus										
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
Marinobacter_articus	CGGATTAATACCGCTACGCCCTTTGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_maritimus_CK47T	CGGATTAATACCGCTACGCCCTTTGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_sediminum_R65	CGGATTAATACCGCTACGCCCTTTGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_goseongensis_En6	CGGATTAATACCGCTACGCCCTTTGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_guineae_LGM24048	CGGATTAATACCGCTACGCCCTTTGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_taiwanensis_GI-17	CGGATTAATACCGCTACGCCCTTTGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_zhejiangensis_CN7	GTTCGTAATACCGCTACGCCCTAAGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_sp._LB	CGGATTAATACCGCTACGCCCTTTGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_bryozoorum_PTG4-1	CGGATTAATACCGCTACGCCCTTTGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_lacisalsi_FP2.5	CGGATTAATACCGCTACGCCCTTTGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_salsuginis_SD-14	CGGATTAATACCGCTACGCCCTTTGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_zhanjiangensis_JS	CGGATTAATACCGCTACGCCCTTTGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_koreensis_KGB22	CGGATTAATACCGCTACGCCCTTTGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_algicola_DG893	CGGATTAATACCGCTACGCCCTTTGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_excellens_KMM3809	GTTCGTAATACCGCTACGCCCTACGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_litoralis_SW-45	GCTCGTAATACCGCTACGCCCTACGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_bacchus_FB3	GCTCGTAATACCGCTACGCCCTACGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_alkaliphilus_2PR5	CGGATTAATACCGCTACGCCCTTTGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_flavimaris_2PR54-	CGGATTAATACCGCTACGCCCTTTGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_kribbensis_Isol7	CGGATTAATACCGCTACGCCCTTTGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_daepoensis_SW-156	GTTCGTAATACCGCTACGCCCTACGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_guadonensis_SL014	CGGATTAATACCGCTACGCCCTTTGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_bryozoorum_FR53-1	CGGATTAATACCGCTACGCCCTACGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_segnicrescens_MP	CGGATTAATACCGCTACGCCCTTTGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_aquaeolei	CGGATTAATACCGCTACGCCCTTTGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_lutaeensis_T5054	CGGATTAATACCGCTACGCCCTTTGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_hydrocarbonoclast	CGGATTAATACCGCTACGCCCTACGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_santoriniensis_NK	CGGATTAATACCGCTACGCCCTACGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_mobilis_B17	CGGATTAATACCGCTACGCCCTTTGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_saliocampi_ISL-40	CGGATTAATACCGCTACGCCCTTTGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_psychrophilus_BSI	CGGATTAATACCGCTACGCCCTTTGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_lipolyticus_SM-19	CGGATTAATACCGCTACGCCCTTTGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_haloterrigenus_FP	CGGATTAATACCGCTACGCCCTTTGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Marinobacter_sztusaonensis_NTU	CGGATTAATACCGCTACGCCCTTTGGGGAAGACAGGGGATC	TTCCGACCTT	CGCTATCAGATGAGCTTAAGCCGGGTAGCTAGTGGTAG							
Salinibacter_ruber_M31	GTGGCTTAATACCGC	AGCTGCTTGGATCCCGCATGGGACCCAGATGAAGCCTTCGGGCGCTTTGGATGGCTTGCCTGGTGGTGGTGA								
Clustal Consensus										
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
Marinobacter_articus	GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGAATGAGACACGGGCCGAACTCCTACGGGAGGACGACGT									
Marinobacter_maritimus_CK47T	GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGAATGAGACACGGGCCGAACTCCTACGGGAGGACGACGT									
Marinobacter_sediminum_R65	GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGAATGAGACACGGGCCGAACTCCTACGGGAGGACGACGT									
Marinobacter_goseongensis_En6	GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGAATGAGACACGGGCCGAACTCCTACGGGAGGACGACGT									
Marinobacter_guineae_LGM24048	GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGAATGAGACACGGGCCGAACTCCTACGGGAGGACGACGT									
Marinobacter_taiwanensis_GI-17	GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGAATGAGACACGGGCCGAACTCCTACGGGAGGACGACGT									
Marinobacter_zhejiangensis_CN7	GGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGAATGAGACACGGGCCGAACTCCTACGGGAGGACGACGT									
Marinobacter_sp._LB	GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGAATGAGACACGGGCCGAACTCCTACGGGAGGACGACGT									
Marinobacter_bryozoorum_PTG4-1	GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGAATGAGACACGGGCCGAACTCCTACGGGAGGACGACGT									
Marinobacter_lacisalsi_FP2.5	GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGAATGAGACACGGGCCGAACTCCTACGGGAGGACGACGT									
Marinobacter_salsuginis_SD-14	GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGAATGAGACACGGGCCGAACTCCTACGGGAGGACGACGT									
Marinobacter_zhanjiangensis_JS	GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGAATGAGACACGGGCCGAACTCCTACGGGAGGACGACGT									
Marinobacter_koreensis_KGB22	GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGAATGAGACACGGGCCGAACTCCTACGGGAGGACGACGT									
Marinobacter_algicola_DG893	GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGAATGAGACACGGGCCGAACTCCTACGGGAGGACGACGT									
Marinobacter_excellens_KMM3809	GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGAATGAGACACGGGCCGAACTCCTACGGGAGGACGACGT									
Marinobacter_litoralis_SW-45	GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGAATGAGACACGGGCCGAACTCCTACGGGAGGACGACGT									
Marinobacter_vinifirmus_FB1	GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGAATGAGACACGGGCCGAACTCCTACGGGAGGACGACGT									
Marinobacter_bacchus_FB3	GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGAATGAGACACGGGCCGAACTCCTACGGGAGGACGACGT									
Marinobacter_alkaliphilus_2PR5	GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGAATGAGACACGGGCCGAACTCCTACGGGAGGACGACGT									
Marinobacter_flavimaris_2PR54-	GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGAATGAGACACGGGCCGAACTCCTACGGGAGGACGACGT									
Marinobacter_kribbensis_Isol7	GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGAATGAGACACGGGCCGAACTCCTACGGGAGGACGACGT									
Marinobacter_daepoensis_SW-156	GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGAATGAGACACGGGCCGAACTCCTACGGGAGGACGACGT									
Marinobacter_guadonensis_SL014	GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGAATGAGACACGGGCCGAACTCCTACGGGAGGACGACGT									
Marinobacter_bryozoorum_FR53-1	GGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGAATGAGACACGGGCCGAACTCCTACGGGAGGACGACGT									
Marinobacter_segnicrescens_MP	GGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGAATGAGACACGGGCCGAACTCCTACGGGAGGACGACGT									
Marinobacter_aquaeolei	GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGAATGAGACACGGGCCGAACTCCTACGGGAGGACGACGT									
Marinobacter_lutaeensis_T5054	GGTAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGAATGAGACACGGGCCGAACTCCTACGGGAGGACGACGT									

Tesista Jhosep S. Avila Oroya

Tesista Jhosep S. Avila Oroya

Tesista Josep S. Avila Oroya

Tesista Jhosep S. Avila Oroya

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

M.hydrocarbonoclasticus_ATCC49 CGGACGGGTGAGTAATGCTTGAAGATCTGCCAGTAGTGGGGGATGCCCGGGGAAACCGGATTAATACCGCTATCGTCTACGGGAGAAAGCAGGGG

M.hydrocarbonoclasticus_K-W47 ATCTTCGGACCTTGCCTGATTGGATGAGCCTATGCCCAATAGTGGGGATAGCCCGGGGAAACCGGATTAATACCGCTATCGTCTACGGGAGAAAGCAGGGG

M.hydrocarbonoclasticus_s#40 CGGACGGGTGAGTAATGCTTGAAGATCTGCCCAATAGTGGGGATAGCCCGGGGAAACCGGATTAATACCGCTATCGTCTACGGGAGAAAGCAGGGG

M.hydrocarbonoclasticus_NY-9 CGGACGGGTGAGTAATGCTTGAAGATCTGCCCAATAGTGGGGATAGCCCGGGGAAACCGGATTAATACCGCTATCGTCTACGGGAGAAAGCAGGGG

M.sp._EM493 CGGACGGGTGAGTAATGCTTGAAGATCTGCCCAATAGTGGGGATAGCCCGGGGAAACCGGATTAATACCGCTATCGTCTACGGGAGAAAGCAGGGG

M.hydrocarbonoclasticus_NBRC10 CGGACGGGTGAGTAATGCTTGAAGATCTGCCCAATAGTGGGGATAGCCCGGGGAAACCGGATTAATACCGCTATCGTCTACGGGAGAAAGCAGGGG

M.sp._CAB CGGACGGGTGAGTAATGCTTGAAGATCTGCCCAATAGTGGGGATAGCCCGGGGAAACCGGATTAATACCGCTATCGTCTACGGGAGAAAGCAGGGG

Marinobacter_sp._LB CGGACGGGTGAGTAATGCTTGAAGATCTGCCCAATAGTGGGGATAGCCCGGGGAAACCGGATTAATACCGCTATCGTCTACGGGAGAAAGCAGGGG

M.hydrocarbonoclasticus CGGACGGGTGAGTAATGCTTGAAGATCTGCCCAATAGTGGGGATAGCCCGGGGAAACCGGATTAATACCGCTATCGTCTACGGGAGAAAGCAGGGG

M.hydrocarbonoclasticus_MARC4F CGGACGGGTGAGTAATGCTTGAAGATCTGCCCAATAGTGGGGATAGCCCGGGGAAACCGGATTAATACCGCTATCGTCTACGGGAGAAAGCAGGGG

M.alkaliphilus_2PR56-13 CGGACGGGTGAGTAATGCTTGAAGATCTGCCCAATAGTGGGGATAGCCCGGGGAAACCGGATTAATACCGCTATCGTCTACGGGAGAAAGCAGGGG

M.daepensis_SW-156 CGGACGGGTGAGTAATGCTTGAAGATCTGCCCAATAGTGGGGATAGCCCGGGGAAACCGGATTAATACCGCTATCGTCTACGGGAGAAAGCAGGGG

Clustal Consensus *****

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200

M.hydrocarbonoclasticus_ATCC49 ATCTTCGGACCTTGCCTGATTGGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAAGAT

M.hydrocarbonoclasticus_K-W47 ATCTTCGGACCTTGCCTGATTGGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAAGAT

M.hydrocarbonoclasticus_s#40 ATCTTCGGACCTTGCCTGATTGGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAAGAT

M.hydrocarbonoclasticus_NY-9 ATCTTCGGACCTTGCCTGATTGGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAAGAT

M.sp._EM493 ATCTTCGGACCTTGCCTGATTGGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAAGAT

M.hydrocarbonoclasticus_NBRC10 ATCTTCGGACCTTGCCTGATTGGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAAGAT

M.sp._CAB ATCTTCGGACCTTGCCTGATTGGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAAGAT

Marinobacter_sp._LB ATCTTCGGACCTTGCCTGATTGGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAAGAT

M.hydrocarbonoclasticus ATCTTCGGACCTTGCCTGATTGGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAAGAT

M.hydrocarbonoclasticus_MARC4F ATCTTCGGACCTTGCCTGATTGGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAAGAT

M.alkaliphilus_2PR56-13 ATCTTCGGACCTTGCCTGATTGGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAAGAT

M.daepensis_SW-156 ATCTTCGGACCTTGCCTGATTGGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAAGAT

Clustal Consensus *****

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300

M.hydrocarbonoclasticus_ATCC49 GATCAGCCACATCGGGATCGAGACGCGCCGAATCTCTACGGAGGACAGCATGGGGAATATTGGACAATGGGGCAACCGTGATCCAGCATGCGCG

M.hydrocarbonoclasticus_K-W47 GATCAGCCACATCGGGATCGAGACGCGCCGAATCTCTACGGAGGACAGCATGGGGAATATTGGACAATGGGGCAACCGTGATCCAGCATGCGCG

M.hydrocarbonoclasticus_s#40 GATCAGCCACATCGGGATCGAGACGCGCCGAATCTCTACGGAGGACAGCATGGGGAATATTGGACAATGGGGCAACCGTGATCCAGCATGCGCG

M.hydrocarbonoclasticus_NY-9 GATCAGCCACATCGGGATCGAGACGCGCCGAATCTCTACGGAGGACAGCATGGGGAATATTGGACAATGGGGCAACCGTGATCCAGCATGCGCG

M.sp._EM493 GATCAGCCACATCGGGATCGAGACGCGCCGAATCTCTACGGAGGACAGCATGGGGAATATTGGACAATGGGGCAACCGTGATCCAGCATGCGCG

M.hydrocarbonoclasticus_NBRC10 GATCAGCCACATCGGGATCGAGACGCGCCGAATCTCTACGGAGGACAGCATGGGGAATATTGGACAATGGGGCAACCGTGATCCAGCATGCGCG

M.sp._CAB GATCAGCCACATCGGGATCGAGACGCGCCGAATCTCTACGGAGGACAGCATGGGGAATATTGGACAATGGGGCAACCGTGATCCAGCATGCGCG

Marinobacter_sp._LB GATCAGCCACATCGGGATCGAGACGCGCCGAATCTCTACGGAGGACAGCATGGGGAATATTGGACAATGGGGCAACCGTGATCCAGCATGCGCG

M.hydrocarbonoclasticus GATCAGCCACATCGGGATCGAGACGCGCCGAATCTCTACGGAGGACAGCATGGGGAATATTGGACAATGGGGCAACCGTGATCCAGCATGCGCG

M.hydrocarbonoclasticus_MARC4F GATCAGCCACATCGGGATCGAGACGCGCCGAATCTCTACGGAGGACAGCATGGGGAATATTGGACAATGGGGCAACCGTGATCCAGCATGCGCG

M.alkaliphilus_2PR56-13 GATCAGCCACATCGGGATCGAGACGCGCCGAATCTCTACGGAGGACAGCATGGGGAATATTGGACAATGGGGCAACCGTGATCCAGCATGCGCG

M.daepensis_SW-156 GATCAGCCACATCGGGATCGAGACGCGCCGAATCTCTACGGAGGACAGCATGGGGAATATTGGACAATGGGGCAACCGTGATCCAGCATGCGCG

Clustal Consensus *****

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400

M.hydrocarbonoclasticus_ATCC49 TGTGTGAAGAAGGCTTTCCGGTTGTAAGACCTTTTCAGTAGGAGGAAACCTTATGGCTAATACCCATGAGGCTGTGAGCTTACTACAGAAGAGACCC

M.hydrocarbonoclasticus_K-W47 TGTGTGAAGAAGGCTTTCCGGTTGTAAGACCTTTTCAGTAGGAGGAAACCTTATGGCTAATACCCATGAGGCTGTGAGCTTACTACAGAAGAGACCC

M.hydrocarbonoclasticus_s#40 TGTGTGAAGAAGGCTTTCCGGTTGTAAGACCTTTTCAGTAGGAGGAAACCTTATGGCTAATACCCATGAGGCTGTGAGCTTACTACAGAAGAGACCC

M.hydrocarbonoclasticus_NY-9 TGTGTGAAGAAGGCTTTCCGGTTGTAAGACCTTTTCAGTAGGAGGAAACCTTATGGCTAATACCCATGAGGCTGTGAGCTTACTACAGAAGAGACCC

M.sp._EM493 TGTGTGAAGAAGGCTTTCCGGTTGTAAGACCTTTTCAGTAGGAGGAAACCTTATGGCTAATACCCATGAGGCTGTGAGCTTACTACAGAAGAGACCC

M.hydrocarbonoclasticus_NBRC10 TGTGTGAAGAAGGCTTTCCGGTTGTAAGACCTTTTCAGTAGGAGGAAACCTTATGGCTAATACCCATGAGGCTGTGAGCTTACTACAGAAGAGACCC

M.sp._CAB TGTGTGAAGAAGGCTTTCCGGTTGTAAGACCTTTTCAGTAGGAGGAAACCTTATGGCTAATACCCATGAGGCTGTGAGCTTACTACAGAAGAGACCC

Marinobacter_sp._LB TGTGTGAAGAAGGCTTTCCGGTTGTAAGACCTTTTCAGTAGGAGGAAACCTTATGGCTAATACCCATGAGGCTGTGAGCTTACTACAGAAGAGACCC

M.hydrocarbonoclasticus TGTGTGAAGAAGGCTTTCCGGTTGTAAGACCTTTTCAGTAGGAGGAAACCTTATGGCTAATACCCATGAGGCTGTGAGCTTACTACAGAAGAGACCC

M.hydrocarbonoclasticus_MARC4F TGTGTGAAGAAGGCTTTCCGGTTGTAAGACCTTTTCAGTAGGAGGAAACCTTATGGCTAATACCCATGAGGCTGTGAGCTTACTACAGAAGAGACCC

M.alkaliphilus_2PR56-13 TGTGTGAAGAAGGCTTTCCGGTTGTAAGACCTTTTCAGTAGGAGGAAACCTTATGGCTAATACCCATGAGGCTGTGAGCTTACTACAGAAGAGACCC

M.daepensis_SW-156 TGTGTGAAGAAGGCTTTCCGGTTGTAAGACCTTTTCAGTAGGAGGAAACCTTATGGCTAATACCCATGAGGCTGTGAGCTTACTACAGAAGAGACCC

Clustal Consensus *****

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500

M.hydrocarbonoclasticus_ATCC49 GGCCTAACCTCGTCCGACAGCCCGGTAATACGGAGGTCAGACGTTAATCGGAATTATCGGGCTAAAGCCGCCGTAGGTGGTTGGTAAGCAGAGTG

M.hydrocarbonoclasticus_K-W47 GGCCTAACCTCGTCCGACAGCCCGGTAATACGGAGGTCAGACGTTAATCGGAATTATCGGGCTAAAGCCGCCGTAGGTGGTTGGTAAGCAGAGTG

M.hydrocarbonoclasticus_s#40 GGCCTAACCTCGTCCGACAGCCCGGTAATACGGAGGTCAGACGTTAATCGGAATTATCGGGCTAAAGCCGCCGTAGGTGGTTGGTAAGCAGAGTG

M.hydrocarbonoclasticus_NY-9 GGCCTAACCTCGTCCGACAGCCCGGTAATACGGAGGTCAGACGTTAATCGGAATTATCGGGCTAAAGCCGCCGTAGGTGGTTGGTAAGCAGAGTG

M.sp._EM493 GGCCTAACCTCGTCCGACAGCCCGGTAATACGGAGGTCAGACGTTAATCGGAATTATCGGGCTAAAGCCGCCGTAGGTGGTTGGTAAGCAGAGTG

M.hydrocarbonoclasticus_NBRC10 GGCCTAACCTCGTCCGACAGCCCGGTAATACGGAGGTCAGACGTTAATCGGAATTATCGGGCTAAAGCCGCCGTAGGTGGTTGGTAAGCAGAGTG

M.sp._CAB GGCCTAACCTCGTCCGACAGCCCGGTAATACGGAGGTCAGACGTTAATCGGAATTATCGGGCTAAAGCCGCCGTAGGTGGTTGGTAAGCAGAGTG

Marinobacter_sp._LB GGCCTAACCTCGTCCGACAGCCCGGTAATACGGAGGTCAGACGTTAATCGGAATTATCGGGCTAAAGCCGCCGTAGGTGGTTGGTAAGCAGAGTG

M.hydrocarbonoclasticus GGCCTAACCTCGTCCGACAGCCCGGTAATACGGAGGTCAGACGTTAATCGGAATTATCGGGCTAAAGCCGCCGTAGGTGGTTGGTAAGCAGAGTG

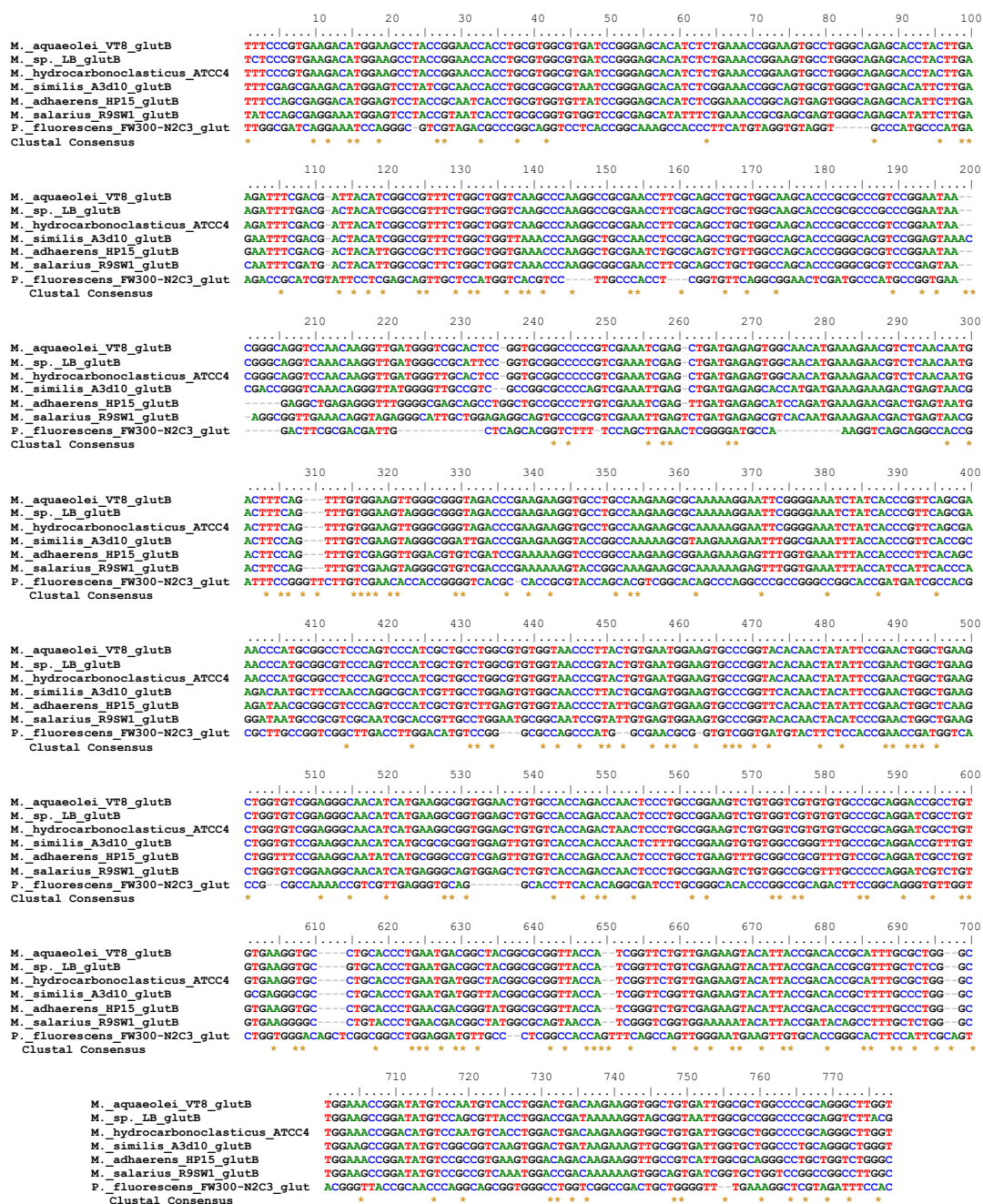
M.hydrocarbonoclasticus_MARC4F GGCCTAACCTCGTCCGACAGCCCGGTAATACGGAGGTCAGACGTTAATCGGAATTATCGGGCTAAAGCCGCCGTAGGTGGTTGGTAAGCAGAGTG

M.alkaliphilus_2PR56-13 GGCCTAACCTCGTCCGACAGCCCGGTAATACGGAGGTCAGACGTTAATCGGAATTATCGGGCTAAAGCCGCCGTAGGTGGTTGGTAAGCAGAGTG

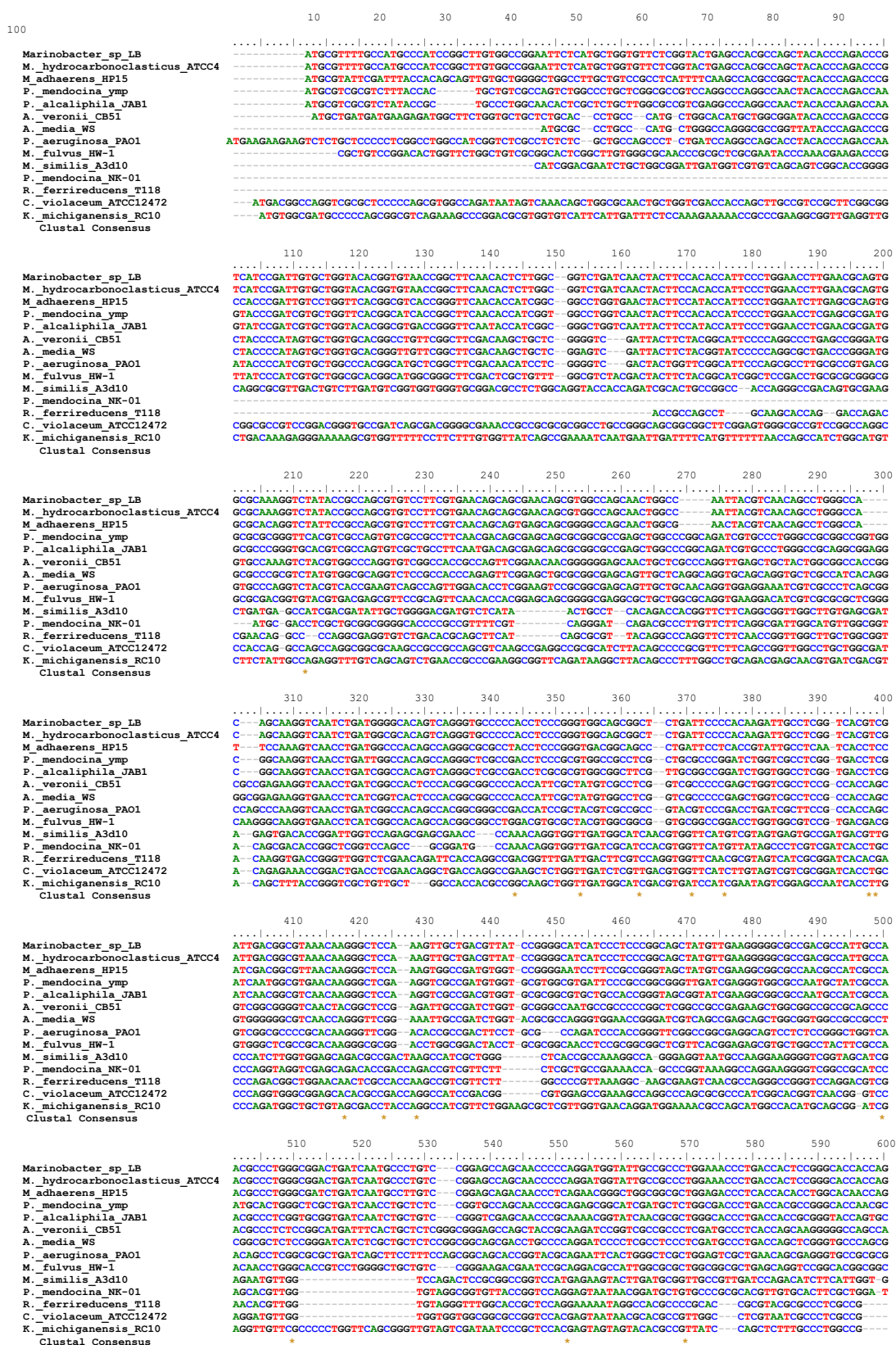
M.daepensis_SW-156 GGCCTAACCT

Tesista Ihosep S. Avila Orova

Anexo N° 4: Alineamiento de secuencias nucleotídicas de los genes *glut* de especies cercanas a *Marinobacter* sp. LB y el grupo externo *Pseudomonas fluorescens* FW300-N2C3. Los (*) representan los sitios conservados en todas las secuencias alineadas. Los (-) indican la presencia de gaps.



Anexo N° 5: Alineamiento de secuencias nucleotídicas de genes *lip* con altos porcentajes de similitud con *Marinobacter* sp. LB. Los (*) representan los sitios conservados en todas las secuencias alineadas. Los (-) indican la presencia de gaps.



	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
Marinobacter_sp_LB
M_hydrocarbonoclasticus_ATCC4
M_adhaerens_HP15
P_mendocina_ymp
P_alcaliphila_JAB1
A_veronii_CB51
A_media_WS
P_aeruginosa_PAO1
M_fulvus_HW-1
M_similis_A3d10
P_mendocina_NK-01
R_ferriredudens_T118
C_violaceum_ATCC12472
K_michiganensis_RC10
Clustal Consensus
	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
Marinobacter_sp_LB
M_hydrocarbonoclasticus_ATCC4
M_adhaerens_HP15
P_mendocina_ymp
P_alcaliphila_JAB1
A_veronii_CB51
A_media_WS
P_aeruginosa_PAO1
M_fulvus_HW-1
M_similis_A3d10
P_mendocina_NK-01
R_ferriredudens_T118
C_violaceum_ATCC12472
K_michiganensis_RC10
Clustal Consensus
	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
Marinobacter_sp_LB
M_hydrocarbonoclasticus_ATCC4
M_adhaerens_HP15
P_mendocina_ymp
P_alcaliphila_JAB1
A_veronii_CB51
A_media_WS
P_aeruginosa_PAO1
M_fulvus_HW-1
M_similis_A3d10
P_mendocina_NK-01
R_ferriredudens_T118
C_violaceum_ATCC12472
K_michiganensis_RC10
Clustal Consensus
	910	920	930	940	950	960	970			
Marinobacter_sp_LB			
M_hydrocarbonoclasticus_ATCC4			
M_adhaerens_HP15			
P_mendocina_ymp			
P_alcaliphila_JAB1			
A_veronii_CB51			
A_media_WS			
P_aeruginosa_PAO1			
M_fulvus_HW-1			
M_similis_A3d10			
P_mendocina_NK-01			
R_ferriredudens_T118			
C_violaceum_ATCC12472			
K_michiganensis_RC10			
Clustal Consensus			